



## 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학박사학위논문

아임계수 전처리를 기반으로 한  
백합나무의 분획 공정에 대한 연구

A Study on Fractionation Process of  
Tulip Tree Based on Subcritical Water  
Pretreatment

2013 년 8 월

서울대학교 대학원

화학생물공학부

김 대 성

## 요약

# 아임계수 전처리를 기반으로 한 백합나무의 분획 공정에 대한 연구

서울대학교 대학원

화학생물공학부

김대성

환경 보존에 대한 관심이 증가하고 석유 자원의 고갈에 대한 우려가 제기되면서 전통적인 석유 기반 산업으로부터 벗어나기 위한 여러 가지 노력이 진행되고 있다. 그 중 바이오매스는 자원량이 풍부하면서도 석유 대체 에너지원과 새로운 화학제품 원료에 대한 요구를 동시에 충족시킬 수 있어 큰 주목을 받아왔다. 섬유소계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 세 가지 천연 고분자를 주성분으로 하는 지구상에서 가장 풍부한 천연자원이다. 섬유소계 바이오매스로부터 얻은 당은 발효를 통해 바이오에탄올과 같은 연료로 이용되며 추가적인 생물, 화학적 반응을 통해 석유계 플라스틱 등의 대체 물질로 이용할 수도 있다. 그러나 복잡한 구조와 다양한 구성 성분으로 인해 있는 그대로 이용하기에는 한계가 있어 후속 당화, 발효 등의 공정 효율을 높이기 위한 전처리 공정에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이에 산 처리, 염기 처리, 증기 폭쇄 등 여러 가지 방법들이 제안되고 있지만 아직까지는 가장 효율적이면서 환경오염으로부터 자유로운 공정은 완성되지 못했다. 또한 대부분의

공정은 구성 성분의 선택적인 분리보다는 포도당 생산 효율 증진에만 초점이 맞추어져 있다.

본 연구에서는 섬유소계 바이오매스의 활용도를 증대시키기 위해 목표를 단순히 셀룰로오스의 당화율 향상에만 국한시키지 않고 백합나무를 모델 물질로 하여 헤미셀룰로오스와 리그닌을 순차적으로 분획하는 통합적인 공정의 개발을 시도하였다. 헤미셀룰로오스의 분획을 위해 아임계수 전처리 공정을 이용하였고, 리그닌의 분획을 위해서는 개미산 전처리와 과산화수소 전처리의 두 가지 방법을 도입하여 평가하였다. 우선 각 전처리 방법의 성능을 개별적으로 고찰하였고, 다음으로 앞선 전처리 공정의 반응 생성물을 다음 전처리 공정의 원료로 사용함으로써 각 공정 간의 연결성을 확보하고자 하였다. 또한 각 전처리 공정 별로 얻어진 고상 시료에 대해 여러 가지 정성 및 정량 분석을 실시하였고 효소 당화를 통해 전처리의 성능을 평가하였다.

우선 백합나무로부터 헤미셀룰로오스의 분획을 위해 아임계수 전처리를 실시하고 전처리물의 물리화학적 특성과 효소 당화율을 가혹성 계수와 연결 지어 고찰해 보았다. 이를 통해 전처리된 바이오매스의 성질은 반응의 가혹성에 따라 정성적, 정량적으로 모두 영향을 받을 수 있었고, 특히 헤미셀룰로오스와 같은 셀룰라아제 당화 방해 물질의 제거가 포도당의 회수에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 다음으로 리그닌의 선택적 분획을 위해 개미산 또는 과산화수소를 이용하는 두 가지 공정을 도입하여 실험을 실시하였고 그 결과를 비교, 평가하였다. 헤미셀룰로오스와 리그닌이 제거된 고상 시료의 정성, 정량적 분석 및 효소 당화를 실시하였다. 두 단계의 전처리를 거침으로써 헤미셀룰로오스와 리그닌을 높은 비율로 분리해낼

수 있었고, 이렇게 얻은 시료의 효소 당화율은 아임계수 전처리만 거친 시료의 당화율에 비해 급격히 향상되었다. 한편 두 가지 탈리그닌 공정을 비교한 결과 리그닌 분획율과 셀룰로오스의 순도, 효소 당화율 등 대부분의 지표에서 개미산 공정이 과산화수소 공정보다 조금 더 우수한 것으로 밝혀졌다. 그러나 개미산 공정은 탈포르밀화를 위한 추가적인 처리가 필요하고 반응 조건이 좀 더 가혹하다는 면에서 보완할 점이 있는 것으로 평가되었다.

이러한 각각의 개별 공정에 대한 고찰을 바탕으로 최종적으로 백합나무의 주요 성분을 분획하고 고순도의 셀룰로오스를 얻기 위한 통합 공정의 청사진을 제시하였다.

**주요어:** 백합나무, 아임계수, 개미산, 과산화수소, 전처리, 분획

**학번:** 2007-21172

# 목차

1. 서론 .....	1
1.1. 연구 배경 .....	1
1.2. 섬유소재 바이오매스 .....	4
1.3. 연구 내용 및 범위 .....	10
1.4. 선행연구 검토 .....	11
1.4.1. 생물학적 전처리 .....	12
1.4.2. 물리적 전처리 .....	13
1.4.3. 화학적 전처리 .....	14
1.4.4. 물리화학적 전처리 .....	19
 2. 1 단계: 아임계수 전처리를 통한 헤미셀룰로오스의 분획 .....	22
2.1. 서론 .....	22
2.1.1. 아임계수의 특징과 전처리 반응 기작 .....	23
2.1.2. 가혹성 계수 (Severity factor) .....	26
2.2. 재료 및 장치 .....	28
2.2.1. 원료의 선정 .....	28
2.2.2. 실험 장치 .....	33
2.3. 실험 및 분석 .....	36
2.3.1. 아임계수 전처리 .....	36
2.3.2. 효소 당화 .....	38
2.3.3. 전처리 생성물의 분석 .....	42

2.4. 결과 및 고찰.....	47
2.4.1. 전처리 시료의 수율 및 조성 변화.....	47
2.4.2. 전처리 시료의 물리화학적 특성 변화 .....	52
2.4.3. 전처리 조건에 따른 효소 당화율 변화.....	68
2.5. 결론.....	73
3. 2-1 단계: 개미산 전처리를 통한 리그닌의 분획.....	75
3.1. 서론.....	75
3.2. 재료 및 장치.....	77
3.2.1. 원료 물질 및 시약 .....	77
3.2.2. 실험 장치 .....	78
3.3. 실험 및 분석.....	81
3.3.1. 아임계수 전처리.....	81
3.3.2. 개미산 전처리 및 탈포르밀화.....	82
3.3.3. 효소 당화 .....	86
3.3.4. 전처리 생성물의 분석 .....	88
3.4. 결과 및 고찰.....	93
3.4.1. 전처리 시료의 수율 및 조성 변화.....	93
3.4.2. 전처리 시료의 물리화학적 특성 변화 .....	98
3.4.3. 전처리 단계에 따른 효소 당화율 변화.....	111
3.5. 결론.....	116
4. 2-2 단계: 과산화수소 전처리를 통한 리그닌의 분획.....	117

4.1. 서론.....	117
4.2. 재료 및 장치.....	119
4.2.1. 원료 물질 및 시약.....	119
4.2.2. 실험 장치.....	121
4.3. 실험 및 분석.....	122
4.3.1. 아임계수 전처리.....	122
4.3.2. 과산화수소 전처리.....	123
4.3.3. 효소 당화.....	127
4.3.4. 전처리 생성물의 분석.....	129
4.4. 결과 및 고찰.....	132
4.4.1. 전처리 시료의 수율 및 조성 변화.....	132
4.4.2. 전처리 시료의 물리화학적 특성 변화.....	143
4.4.3. 전처리 조건에 따른 효소 당화율 변화.....	161
4.5. 결론.....	168
5. 종합 결론 및 향후 과제.....	170
참고 문헌 .....	175



## 표 목차

표 1-1. 분획된 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 용도 .....	8
표 2-1. 각 수종의 화학적 조성 분포 .....	32
표 2-2. 각 수종에 함유된 클루칸 함량.....	32
표 2-3. 아임계수 전처리 고상 시료의 효소 당화 조건 .....	41
표 2-4. 산 가용성 리그닌 분석을 위한 바이오매스의 종류별 권장 파장과 흡수능 값 .....	44
표 2-5. 아임계수 전처리 전, 후 고상 시료의 고상 수율과 화학 조성 .....	50
표 2-6. 아임계수 전처리와 선행 연구의 효소 당화 결과 비교 .....	72
표 3-1. 개미산 전처리 공정의 순서와 반응 조건 .....	85
표 3-2. 아임계수 + 개미산 전처리 고상 시료의 효소 당화 조건 ....	87
표 3-3. 다양한 전처리 시료의 고상 수율과 화학 조성 변화 .....	95
표 3-4. 다양한 전처리 시료의 이전 공정 대비 고상 수율과 각 성분 별 제거율 .....	96
표 3-5. 파수에 따른 IR 흡수 피크의 해석과 세기 비교 .....	108
표 4-1. 과산화수소 전처리 공정의 반응 조건 .....	125
표 4-2. 아임계수 + 과산화수소 전처리 고상 시료의 효소 당화 조건 .....	128

표 4-3. 백합나무 탈지 시료의 조건 별 과산화수소 전처리 고상 수율과 화학 조성 변화 .....	134
표 4-4. 아임계수 전처리 시료의 조건 별 과산화수소 전처리 고상 수율과 화학 조성 변화 .....	139
표 4-5. 2 단계 전처리와 선행 연구의 효소 당화 결과 비교 .....	167

## 그림 목차

그림 1-1. 석유 기반 사회와 바이오매스 기반 사회의 비교 .....	3
그림 1-2. (a) 셀룰로오스, (b) 헤미셀룰로오스, (c) 리그닌의 분자 구조 .....	9
그림 2-1. 280 bar 의 압력에서 온도 변화에 따른 물의 성질 변화 ...	25
그림 2-2. 백합나무의 전체적인 모습(좌)과 꽃(중) 및 잎(우)의 생김새 .....	31
그림 2-3. 실험에 사용된 회분식 반응기 .....	34
그림 2-4. 실험에 사용된 용융염조의 모식도(상) 및 실제 모습(하) .....	35
그림 2-5. Celluclast 1.5L(상)과 Novozyme 188(하)의 3 차원 분자 구조 모식도 .....	40
그림 2-6. 전처리 가혹도에 따른 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 제거 수율 .....	51
그림 2-7. 아임계수 전처리 전후의 바이오매스 표면 특성 비교 .....	54
그림 2-8. 아임계수 전처리 전후 고상 시료의 색상 변화 .....	56
그림 2-9 아임계수 전처리 고상 시료의 XRD 분석 결과 .....	58
그림 2-10. 전처리 가혹도에 따른 고상 시료의 CrI 변화 .....	62
그림 2-11. 전처리 가혹도에 따른 액상 가수분해물의 수율과 pH 변화 .....	64
그림 2-12. 아임계수에서 헤미셀룰로오스의 주요 반응 경로 .....	65
그림 2-12. 전처리 조건에 따른 액상 시료내의 당 함량 .....	67

그림 2-13. 48 h 동안의 효소 당화로 얻은 포도당 수율과 전처리 가혹도 사이의 관계 .....	71
그림 3-1. 실험에 사용된 오토클레이브 .....	79
그림 3-2. 실험에 사용된 항온수조 .....	80
그림 3-3. 아임계수 + 개미산 전처리 공정의 순서도 .....	84
그림 3-4. 백합나무의 전처리 단계에 따른 시료의 색상 변화 .....	97
그림 3-5. 다양한 전처리 단계에 따른 바이오매스 표면의 기공 크기 분포 변화 .....	99
그림 3-6. 접근 가능 기공 부피와 전처리 단계별 상관관계 .....	100
그림 3-7. 전처리 단계별 XRD 패턴 비교 .....	103
그림 3-8. 전처리 단계별 CrI 변화 .....	104
그림 3-9. 전처리 단계별 FT-IR 분석 결과 .....	107
그림 3-10. 전처리 단계별 고상 시료 표면의 미세구조 변화 .....	110
그림 3-11. 효소 당화 시간에 따른 각 전처리 단계별 포도당 수율 비교 .....	113
그림 3-12. 전처리 단계에 따른 접근 가능 기공 부피와 포도당 수율(120 h, 5 FPU/g cellulose)과의 관계 비교 .....	114
그림 3-13. 전처리 단계에 따른 리그닌 함량과 포도당 수율(120 h, 5 FPU/g cellulose)과의 관계 비교 .....	115
그림 4-1. 과산화수소(위) 와 망간(III) 아세테이트(아래) 의 구조식 .....	120
그림 4-2. 아임계수 + 과산화수소 전처리 공정의 순서도 .....	126

그림 4-3. 과산화수소 전처리 온도에 따른 백합나무 탈지 시료의 헤미셀룰로오스 제거율 비교 .....	135
그림 4-4. 과산화수소 전처리 온도에 따른 백합나무 탈지 시료의 리그닌 제거율 비교 .....	136
그림 4-5. 과산화수소 전처리된 포플러 절편의 시간에 따른 광학 현미경 사진 .....	140
그림 4-6. 아임계수 전처리 시료 대비 과산화수소 전처리 시료의 리그닌 제거율 비교 .....	141
그림 4-7. 백합나무 탈지 시료 대비 아임계수와 과산화수소 전처리 시료의 리그닌 제거율 비교 .....	142
그림 4-8. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 시간에 따른 색상 변화 비교 .....	145
그림 4-9. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리에 따른 고상과 액상 시료의 색상 비교 .....	146
그림 4-10. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 표면 구조 변화 .....	148
그림 4-11. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 XRD 분석 결과 .....	150
그림 4-12. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 결정화도 변화 .....	151
그림 4-13. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 시간에 따른 색상 변화 비교 .....	154
그림 4-14. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리에 따른 고상과 액상 시료의 색상 비교 .....	155

그림 4-15. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 표면 구조 변화 .....	157
그림 4-16. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 XRD 분석 결과 .....	159
그림 4-17. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 결정화도 변화 .....	160
그림 4-18. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 시간별 효소 당화율 .....	163
그림 4-19. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 시간별 효소 당화율 .....	165
그림 4-20. 아임계수 처리 후 개미산(열은 회색)과 과산화수소(진한 회색)의 2 단계 처리 공정을 거친 시료의 분석 항목별 최대값 비교 .....	169
그림 5-1. 제안된 백합나무 분획 및 전처리 공정의 개념도 .....	174

# 1. 서론

## 1.1. 연구 배경

자연에 대한 인류의 끊임없는 호기심은 오늘날의 급속한 기술 발전을 이루는 원동력이 되어 왔다. 특히 20 세기 이후 여러 가지 자연현상에 대한 이해가 높아짐에 따라 급속한 과학기술의 발전이 이루어졌고, 이에 따라 인류 생활의 편의도 크게 증진되었다. 이러한 급속한 발전의 원동력 중 하나로 석유와 석탄으로 대표되는 화석 연료의 이용을 들 수 있다. 특히 석유는 상대적으로 운반과 저장이 쉽고 다른 형태의 에너지로 전환하기가 쉬워 그 동안 중요한 연료로서 이용되어 왔다. 또한 원유의 정제 과정에서 얻은 여러 가지 형태의 탄화수소들은 플라스틱으로 대표되는 화학제품의 발전에 크게 기여해 왔다.

그러나 이러한 화석 연료는 탄소의 순환 주기가 매우 길어 다시 생성되기까지의 시간이 오래 걸리는 것으로 알려져 있기 때문에 현재와 같은 속도로 사용량이 늘어날 경우 머지않은 미래에 자원이 고갈될 것이 우려되고 있는 상황이다. 또한 화석 연료의 무분별한 이용에 따른 이산화탄소의 배출량 증가와 그에 따른 환경 파괴 및 지구 온난화는 이미 세계적인 문제로 대두되고 있다. 이러한 상황 속에서 각종 환경 관련 법규와 규제 또한 날로 강화되어 가고 있으며, 자원의 불균등 분포로 인한 자원 민족주의가 날로 심해짐에 따라 국가의 안보에까지 영향을 미치고 있는 실정이다. 이러한 배경을 바탕으로 미국과 일본을 비롯한 선진국에서는 이미 수십 년에 걸쳐 화석 연료를 대체할 수 있는

다른 자원에 대한 연구를 진행해 오고 있는데, 태양열 및 태양광, 수력, 지열, 풍력, 바이오매스 등이 유력한 후보로 제시되고 있다. 이러한 대체 자원들은 화석 자원과는 달리 재생 가능한 것들로 주로 에너지원으로서의 이용에 초점이 맞춰져 있으며, 아직 그 효율성이나 경제성이 화석 자원에 미치지 못하는 경우가 많은 것으로 알려져 있다.

그 중 바이오매스로 대표되는 바이오 자원은 에너지원뿐만 아니라 여러 가지 화학제품의 원료로도 쓰일 수 있다는 점에서 주목 받고 있는 자원이다[1]. 이는 바이오매스가 기본적으로 석유처럼 탄소와 수소를 기반으로 이루어졌다는 점에서 기인한 것이다. 특히 그림 1-1 에 나타난 바와 같이 바이오매스를 이용하는 경우 탄소가 순환하는데 걸리는 시간이 수십 년 정도에 불과하며 식물의 생장 과정에서 지구온난화의 주범인 이산화탄소를 흡수하므로 환경적으로도 이점을 가지고 있다. 따라서 기존의 석유 정제에 대한 대안으로 바이오 리파이너리가 주목을 받고 있으며 기술 선점을 위한 경쟁이 전 세계적으로 치열하게 벌어지고 있다.



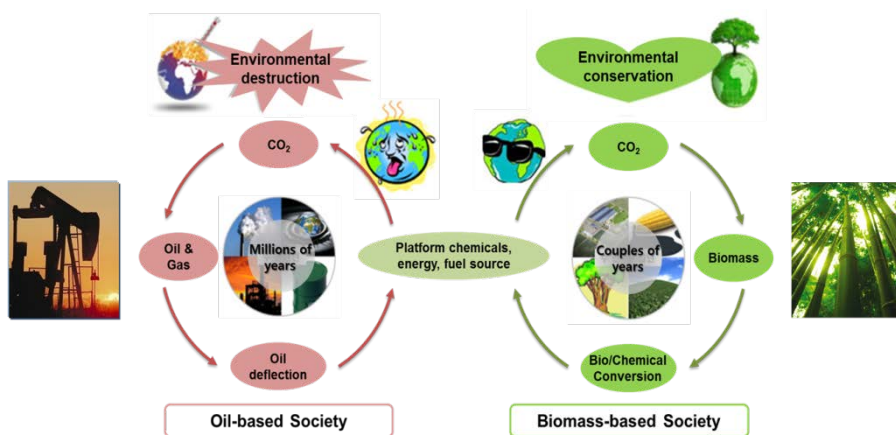


그림 1-1. 석유 기반 사회와 바이오매스 기반 사회의 비교

## 1.2. 섬유소재 바이오매스

바이오매스의 사전적 의미는 어느 시점에 임의의 공간 내에 존재하는 특정 생물체의 총량을 뜻한다[2]. 그러나 최근에는 자원으로서의 중요성 때문에 연료나 에너지원으로 쓰일 수 있는 생물체로부터 유래한 유기 자원을 총칭하는 의미로 더 널리 사용되고 있다. 이는 동식물 및 미생물, 또는 그로부터 나오는 부산물과 폐기물을 포함하는 개념으로 적절한 변환 과정을 거치면 에너지원 또는 산업 재료로 이용할 수 있게 된다. 지구상에 존재하는 바이오매스의 총량은 약  $1.84 \times 10^9$  톤으로 추정되며, 우리 나라에서는 연간 1 억 톤 가량의 바이오매스가 생산되는 것으로 보고되고 있다[3].

바이오매스를 분류하는 방법에는 여러 가지가 있으나 일반적으로 식물로부터 유래한 바이오매스를 분류할 때는 다음과 같이 3 개의 세대로 구분할 수 있다[4]. 1 세대 바이오매스는 옥수수과 사탕수수로 대표되는 곡물과 팥 등의 식물유를 포함하며 바이오에탄올이나 바이오디젤을 얻기 위한 생산 공정이 매우 간단하고 생산비용이 적게 든다는 장점이 있다. 현재 미국이나 브라질에서 바이오에탄올의 원료로 가장 많이 사용하고 있는 것이 바로 1 세대 바이오매스이다. 그러나 1 세대 바이오매스의 대부분은 식량으로도 쓰이기 때문에 식량 안보와 윤리적 측면에서 문제점을 가지고 있다. 또한 넓은 경작지 확보를 위한 추가적인 환경의 훼손이 필수적이라는 결점을 가지고 있다.

이에 대한 대안으로 제시되고 있는 것이 섬유소재 바이오매스라고도 불리는 2 세대 바이오매스이다. 2 세대 바이오매스는 목질계와 초본계, 그리고 이들의 부산물과 폐기물을 포함하는데, 1 세대 바이오매스와는

달리 비식용 식물을 이용하므로 윤리적인 문제에서 비교적 자유로우며 가격이 비싸지 않다. 또한 지구상의 재생 가능한 자원 중 가장 많은 생산량을 가지고 있다는 것도 장점이다[5]. 그러나 복잡한 구조와 성분으로 인해 추가적인 처리 공정을 필요로 한다는 단점이 있다.

3 세대 바이오매스는 바다에서 나는 해조류로서 주로 당의 원료가 되는 김, 미역, 다시마 등의 거대 조류와 바이오티셀의 원료가 되는 미세조류를 포함한다. 특히 3 세대 바이오매스는 성장 속도가 빠르고 단위 면적당 생산량도 많아 차세대 재생 가능 자원으로 주목을 받고 있다. 그러나 바다에서 대량 생산 및 운반, 가공 등에 기술적 한계가 있어 아직은 극복해야 할 점이 더 많은 것으로 알려져 있다.

현재 바이오매스에 대한 연구는 대부분 2 세대인 섬유평 바이오매스를 당화시켜 바이오에탄올을 생산하는데 맞춰져 있다. 섬유평 바이오매스를 산업적으로 이용하는데 있어서 가장 큰 걸림돌이 되는 것은 섬유평 바이오매스 특유의 구조와 구성 성분이다. 섬유평 바이오매스는 크게 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 세 가지 천연 고분자로 구성되는데, 각각의 대략적인 분자 구조를 그림 1-2 에 나타내었다. 여기에 지질, 클로로필, 단백질, 무기질 등의 성분이 소량 포함되는데, 그 종류나 조성은 식물의 종에 따라 큰 차이를 보인다.

셀룰로오스는 단량체인 포도당이  $\beta$ -1,4 글리코사이드 결합을 통해 연결되어 있는 선형의 고분자이며 지구상에서 가장 풍부한 천연 고분자이다[6]. 녹말 역시 포도당만으로 이루어진 고분자이나 결합 형태가  $\alpha$ -1,4 결합으로 분자가 나선 형태를 띠어 조직이 성기기 때문에 물 분자가 침투하기 쉬워 수용성을 지니며 효소에 대한

저항성이 낮아 인간이 소화시킬 수 있다. 반면 셀룰로오스는 포도당 분자의 규칙적인 배열과 이들 분자가 가지는 수산화기(-OH) 사이에 일어나는 수소결합으로 인해 직선 형태의 안정된 사슬을 형성하며 특유의 결정성을 가지게 된다. 따라서 셀룰로오스는 물이나 일반적인 유기 용매에 잘 녹지 않으며 산이나 알칼리에 대한 높은 저항성을 가지게 된다.

헤미셀룰로오스는 5 탄당인 자일로오스를 주요 구성 당으로 하며, 기타 아라비노오스, 만노오스, 갈락토오스, 포도당 등도 일부를 구성한다. 헤미셀룰로오스는 고분자를 구성하는 단량체가 다양하며 가지 형태의 구조를 가지고 분자량이 상대적으로 작다는 점에서 셀룰로오스와 차이를 보인다[6]. 이러한 차이는 상대적으로 효소나 산, 물 등에 의한 공격에 취약한 특징으로 나타난다.

리그닌은 셀룰로오스에 이어 자연계에서 두 번째로 풍부한 고분자로서 페닐프로판 류의 방향족 단량체들이 탄소-탄소 또는 에테르 결합을 하고 있는 고분자라는 점에서 앞서 언급한 두 고분자와 차이점을 보인다. 식물체에서는 세포벽 내에 존재하여 접착제와 같은 역할을 하며 기계적 강성을 부여한다. 주로 제지 산업에서 부산물의 형태로 얻어지며 저급 연료 또는 충전제 등의 제한된 용도로 사용되고 있으나 최근 부가가치를 높일 수 있는 이용 방법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[7, 8].

섬유소계 바이오매스는 여러 가지 물질의 혼합물이기 때문에 연료 등으로 이용하기 위해서는 전처리와 같은 추가적인 가공이 필요하며, 이는 곧 추가적인 공정의 도입으로 인한 경제성의 문제로 이어진다. 최근 고유가 시대가 지속되면서 상대적으로 바이오매스를 이용한

공정의 가격 경쟁력이 증가 하였다고는 하나 최종적으로는 그 자체적으로 경제성을 가지는 공정의 개발이 필수적이다. 최근까지는 바이오에탄올 생산에 있어 사탕수수나 옥수수의 대체 물질로 섬유소계 바이오매스를 이용하려는 연구가 주를 이루었기 때문에 셀룰로오스의 수율 및 효소 당화율 향상을 위한 전처리 방법에 연구의 초점이 맞춰져 왔으나 이것만으로는 한계가 있다. 따라서 표 1-1 에 정리한 바와 같이 셀룰로오스 뿐만 아니라 헤미셀룰로오스, 리그닌 등의 고부가가치 활용에 대한 연구가 필요하며 전체 바이오 리파이너리 공정을 통합적으로 바라보는 안목이 필요하다. 특히 바이오매스로부터 분리하여 얻은 물질들을 화학제품의 원료로 이용하는 경우 연료로 이용할 때보다 더 높은 부가가치를 창출해낼 수 있다. 이를 위해 전처리 과정에서 바이오매스의 주요 구성 성분들을 효과적으로 분리해내는 기술의 개발이 절실하다.

표 1-1. 분획된 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 용도

물질 명	용도
셀룰로오스	<p>바이오연료: bio-ethanol, bio-butanol 등</p> <p>셀룰로오스계 섬유: Lyocell, Tencel 등</p> <p>셀룰로오스 유도체: 필터, 필름, LCD 편광판 등</p> <p>고분자 단량체: putrescine, FDCA, isosorbide 등</p>
헤미셀룰로오스	<p>바이오연료: bio-ethanol 등</p> <p>단당 또는 올리고당: 프리바이오틱스, 기능성 당류 등</p> <p>화학제품 원료: furfural, levulinic acid 등</p>
리그닌	<p>미세 입자 또는 탄화물: 향산화제, 탄소 섬유, 그래핀, 형광 바이오 마커 등</p> <p>페놀계 고분자 단량체</p> <p>화학제품 원료: catechol, vanillin 등</p>

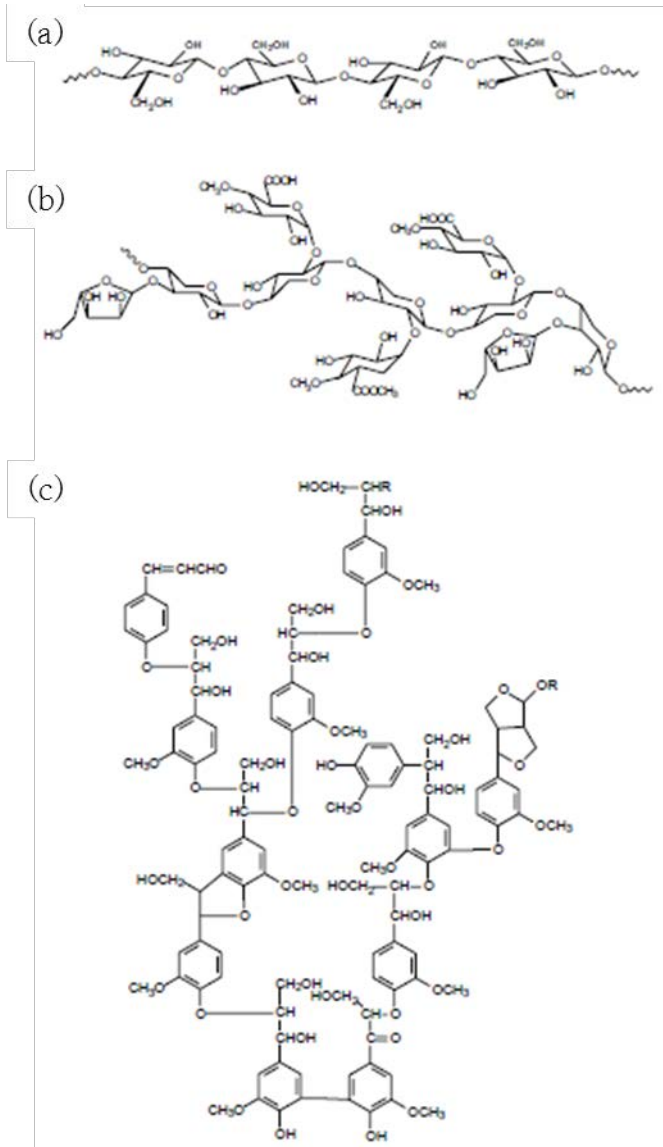


그림 1-2. (a) 셀룰로오스, (b) 헤미셀룰로오스, (c) 리그닌의 분자 구조 [9].

### 1.3. 연구 내용 및 범위

본 연구에서는 섬유소계 바이오매스를 효율적으로 활용하기 위한 바이오 리파이너리의 일부로서 백합나무를 모델 물질로 하여 주요 구성 성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌을 분획하는 통합된 전처리 공정을 제시하고자 하였다. 또한 전처리 후 얻어진 셀룰로오스의 당화율 향상뿐만 아니라 추가적인 화학반응을 통한 고부가가치화를 위해 셀룰로오스의 순도 향상에도 주안점을 두었다.

이를 위하여 활엽수의 일종인 백합나무를 원료로 선정하였고, 주요 세 성분의 분획을 위해 두 가지 단계의 공정을 도입하였다. 먼저 화학적으로 가장 불안정한 헤미셀룰로오스의 제거를 위해 아임계수 전처리를 도입하였고, 주요 실험 변수를 하나로 묶어 그에 따른 전처리 산물의 특성 변화에 대해 고찰하였다. 다음으로 앞에서 얻어진 고상의 아임계수 전처리물에서 리그닌을 제거함으로써 고순도의 셀룰로오스를 얻는 공정을 연구하였다. 이를 위해 알려진 방법 중 아직 연구 결과가 많이 보고되지 않은 개미산과 과산화수소를 공정에 도입하였으며 리그닌의 분획률과 얻어진 셀룰로오스의 순도에 대해 비교 분석하였다. 각 개별 공정에 의해 얻어진 고상 전처리물에 대한 효소 당화율 분석도 진행하였다. 본 연구를 통해 얻은 결과들은 전체 목질계 바이오 리파이너리 공정 개발에 대한 기초적인 정보를 제공하고 보다 개선된 연구 방향을 제시하게 될 것이다.



#### 1.4. 선행연구 검토

앞에서도 설명했듯이 전처리는 섬유소계 바이오매스의 활용에 있어 가장 중요한 공정이다. 그 중요성만큼이나 다양한 전처리 방법에 대한 연구가 시도되어 왔으며, 주로 후속 당화 및 발효 공정의 효율 향상에 초점을 맞추어 개별 공정에 대한 연구가 진행되었으나 각 공정을 조합하는 연구도 보고된 바 있다. 각 전처리 방법은 장단점을 가지고 있으며, 식물체의 종이나 구성 성분, 환경 등에 따라 다르게 적용될 수 있어 어느 것이 우수하다고 선불리 결론 내릴 수는 없다[10]. 개별 전처리 공정은 바이오매스의 구조와 화학 성분에 어떤 식으로 영향을 주는지에 따라 크게 다음의 네 가지로 분류할 수 있다[11].

#### 1.4.1. 생물학적 전처리

생물학적 전처리는 주로 리그닌이나 헤미셀룰로오스 분해 효소를 함유한 미생물을 이용한 전처리 방법이다. 생물학적 전처리에 주로 사용되는 미생물로는 갈색부후균, 흰색부후균 또는 연부후균 등이 있으며, 특히 흰색부후균은 페록시다아제나 락카아제와 같은 리그닌 분해 효소를 통해 섬유소계 바이오매스의 물리화학적 구조를 변화시켜 당화율을 높이는데 효과적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[12]. 생물학적 전처리는 장치비용이 저렴하고 에너지가 적게 들며, 반응 조건이 덜 가혹하다. 또한 화학약품의 사용이 필요하지 않은 것도 장점이다. 그러나 가수분해의 속도가 매우 느리고 환경의 제약을 다소 받는다는 것은 개선해야 할 점으로 지적되고 있다[13].

#### 1.4.2. 물리적 전처리

물리적 전처리법은 일반적으로 기계적인 분쇄, 연마, 절삭 등을 포함하는 것으로 주 목적은 기계적 압력을 통해 바이오매스 입자의 크기, 바이오매스의 중합도와 결정화도를 감소시키고 표면적을 높임으로써 당화 효율을 증진시키는데 있다. 그러나 리그닌이나 헤미셀룰로오스 등의 성분이 그대로 남아 있으므로 근본적인 한계가 있으며, 에너지의 사용량도 종이나 함수율, 입자의 크기에 따라 다르기는 하나 대체로 큰 편이다[14]. 기계적 분쇄는 에너지 소모가 많아 대형화하기 어렵고 단일 방법으로는 경제성이 부족하나[15] 물질간의 접촉 면적을 넓히고 셀룰로오스의 결정화도 감소에 영향을 주므로 다른 전처리 방법에 앞서 행해지는 경우 좋은 효과를 기대할 수 있다. 최근에는 압출법이나 극초단파를 이용한 전처리 방법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[16, 17]. 이러한 방법들은 엄밀하게는 전형적인 물리적 전처리 방법은 아니고 다른 형태의 전처리 방법과 결합한 것으로 볼 수 있다.

### 1.4.3. 화학적 전처리

#### 알칼리 전처리 (Alkali pretreatment)

알칼리 전처리는 주로 리그닌의 용해에 보다 효과적인 것으로 알려져 있으며 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스의 용해도에 대한 영향은 산 전처리이나 수열 전처리법에 비해 적은 편이다[18]. 알칼리 전처리에 쓰이는 물질은 주로 나트륨이나 칼륨, 칼슘, 암모늄 등의 수산화물로서 특히 수산화나트륨을 사용하는 경우 셀룰로오스 분자의 팽윤(swelling)을 일으켜 결정성을 떨어뜨리고 표면적을 증가시키는 것이 보고되어 있다[19].

최근에는 수산화칼슘을 이용한 전처리 방법에 대한 연구도 많이 보고되고 있으며 목질계보다는 주로 초본계 바이오매스를 이용한 연구가 이루어져 왔다[20-23]. 수산화칼슘 전처리의 경우 수산화나트륨이나 수산화칼륨과 같은 강염기를 사용하는 것보다 안전성 면에서 우수하며 이산화탄소와 반응시키면 쉽게 회수가 가능하므로 경제성도 확보할 수 있어 주목받고 있다[24].

그 외에도 알칼리 조건에서 과산화수소와 같은 산화제를 첨가하는 방법도 보고되어 있다[25]. 과산화수소의 리그닌에 대한 산화 반응은 pH 에 매우 의존적인 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 pH 11.5 이상의 염기성 조건에서 반응이 이루어진다. 이 방법의 경우 일반 알칼리 전처리법에 비해 리그닌 제거율이 높고 가수분해의 결과로 푸르푸랄(furfural)이나 히드록시메틸푸르푸랄(hydroxymethyl furfural, HMF)과 같은 효소 당화 방해 물질이 검출되지 않는다는 장점을 가진다[19].

## 산 전처리 (Acid pretreatment)

산 전처리는 크게 강산 전처리와 약산 전처리를 포함하는 방법으로 주로 헤미셀룰로오스와 일부 리그닌 성분을 가수분해 시킴으로써 셀룰로오스에 대한 효소의 접근성을 높이는데 목적이 있다. 그 중 강산 전처리는 다량의 폐수를 발생시키고 가수분해의 결과로 효소 당화를 방해하는 다양한 부산물이 생성되며 장치의 부식을 야기하는 등의 단점이 있는 것으로 보고되어 있다[26].

약산 전처리는 오랜 시간 동안 가장 널리 연구되고 있는 전처리 방법으로 상업화에도 비교적 근접해 있다고 평가되고 있다. 산으로는 황산이 가장 많이 이용되며 그 밖에도 염산, 질산, 인산 등에 대한 연구도 보고되었다[24]. 대부분 약산 전처리 조건은 160~220 °C의 온도와 수초 내지 수분의 시간 동안 이루어지는 것으로 알려져 있다. 전처리 시간 동안 헤미셀룰로오스는 산 가수분해에 의해 자일란과 같은 올리고당이나 단당류의 형태로 분해된다. 이 공정의 단점은 헤미셀룰로오스로부터 생성된 단당류와 올리고당의 일부가 추가적인 반응을 통해 불필요한 부산물을 생성한다는 점이다. 주요한 당화 및 발효 억제제로는 푸르푸랄, HMF, 레불린산, 개미산, 초산 등이 있다. 생성된 부산물들로 인해 당의 전체 수율이 낮아질 뿐만 아니라 후속 발효공정에서 미생물의 활성에 악영향을 끼치게 된다. 이러한 단점을 보완하기 위해 두 단계에 걸친 약산 전처리법이 보고되었는데, 이 공정을 통해 헤미셀룰로오스 유래 당의 수율이 높아지고, 셀룰로오스의 구조가 분해되기 쉽게 변해 최종적인 당화율이 크게 향상되는 것으로 보고되었다[27, 28].

그 외에도 헤미셀룰로오스의 분해 과정에서 생성되는 유기산을 황산

대신 넣어 전처리에 이용하는 연구도 이루어지고 있다. 푸마르산이나 말레산을 이용한 약산 전처리에 대한 연구 결과가 보고된 바 있으며, 이 경우 황산을 사용했을 때 보다 푸르푸랄과 같은 부산물의 생성이 줄어드는 것이 관찰되었다[29]. 초산이나 개미산 역시 약산 가수분해의 부산물로 관찰되는 유기산으로 초기에는 제지 공학 분야에서 헤미셀룰로오스와 리그닌의 제거를 위한 목적으로 연구가 시작되었으나 점차 섬유소계 바이오매스의 전처리에 대한 적용이 시도되고 있다[30, 31].

#### **오존 전처리 (Ozonolysis)**

오존을 이용한 전처리에 대한 연구는 1980 년대 이후 활발하게 이루어져 왔으며, 이는 주로 오존의 강력한 산화력에 의한 리그닌과 헤미셀룰로오스의 분해에 기인한다[13]. 오존 전처리는 상온, 상압에서 반응이 가능하고 부산물의 생성이 산 전처리에 비해 상대적으로 적으며 리그닌의 제거 수율이 높다는 장점을 가지고 있다[32]. 그러나 필요한 오존의 양이 많고 이에 따른 운전 비용이 많이 든다는 단점이 있다.

#### **유기용매 전처리 (Organosolv)**

유기용매 전처리는 유기용매 또는 그 수용액을 이용하여 섬유소계 바이오매스로부터 리그닌과 헤미셀룰로오스를 추출해내는 전처리 방법이다. 낮은 끓는점을 가지는 유기용매를 사용할 경우 전처리 후 유기용매의 회수 및 재활용이 비교적 쉽고, 비교적 순수한 형태의 리그닌을 얻을 수 있다는 장점이 있다[33]. 유기용매로는 메탄올, 에탄올, 에틸렌글리콜, 아세톤, 디메틸퓨란, 디메틸아세테이트 등

다양한 물질이 적용되어 왔다. 여기에 추가로 산을 촉매로 이용하기도 하는데, 산을 첨가하는 경우 약 185 °C 이상의 높은 온도에서는 리그닌 제거에 별다른 도움이 되지 않으나 헤미셀룰로오스의 제거율은 높아지는 것이 보고된 바 있다[34]. 그러나 이 공정은 전처리에 사용되는 유기용매가 대부분 높은 휘발성과 인체에 대한 독성을 띄며 후속 당화 및 발효 공정에도 부정적인 영향을 주므로 추가적인 세척이 필수적이라는 단점을 가지고 있다.

### **이온성 액체 전처리 (Ionic liquid pretreatment)**

이온성 액체 전처리법은 약 10 여년 전 이온성 액체에 의한 셀룰로오스의 용해가 보고되면서 주목받기 시작하였으며[35], 최근 이온성 액체에 대한 관심과 이해가 급격히 증가함에 따라 새롭게 대두되고 있는 전처리 방법이다. 이온성 액체의 일반적인 성질로는 비교적 낮은 온도 (100 °C 이하) 에서 액체 상으로 존재하며 휘발성이 거의 없고 불연성이며 고이온 도전성을 가진다는 점 등이 있다. 또한 양이온과 음이온의 조합을 달리하여 물성을 조절할 수 있기 때문에 매우 다양한 성질을 가지도록 조절할 수 있다. 일부 이온성 액체는 강력한 수소결합의 생성으로 인해 셀룰로오스의 용해에 탁월한 효과를 보이는 것으로 알려져 있으며, 이렇게 이온성 액체 전처리로 얻어진 반응물은 구조적으로 효소 당화에 유리하게 변형되며 부산물의 생성이 적다. 또한 산성 이온성 액체를 사용하는 경우 셀룰로오스를 가수분해 시켜 올리고머 형태로 얻을 수 있음을 확인하였다[36]. 이는 후속 당화 공정에서 효소의 사용량을 획기적으로 줄일 수 있음을 의미한다. 이러한 장점들에도 불구하고 이온성 액체 전처리 공정이 상업화 되기에는 많은 난관이 있다. 이온성

액체의 비싼 가격으로 인한 효율적인 회수 및 재활용 공정의 개발은 여전히 숙제로 남아 있으며, 이온성 액체의 당화, 발효 공정에 대한 영향도 추가적으로 검증되어야 한다. 셀룰로오스의 추출 후 용액으로부터 헤미셀룰로오스와 리그닌을 회수할 수 있는 기술에 대한 연구도 필요하다[37].



#### 1.4.4. 물리화학적 전처리

##### 증기 폭쇄 (Steam explosion)

증기 폭쇄는 가장 널리 도입된 물리화학적 전처리 방법으로 바이오매스를 고온, 고압의 증기에 수초 내지 수분 동안 노출시킨 뒤 순간적인 압력 강하를 시킴으로써 이루어진다. 이 방법은 고온의 증기에 의한 화학적 가수분해와 순간적인 압력 변화에 따른 물리적인 구조의 변화를 동시에 일으킬 수 있다. 증기 폭쇄를 통해 헤미셀룰로오스가 가수분해되어 제거되며 고온에 의한 리그닌의 변형도 관찰된다[13]. 지금까지 소나무[38], 밀짚[39], 유칼립투스[40], 올리브 찌꺼기[41] 등 다양한 종류의 섬유소계 바이오매스에 대한 연구가 보고되었다.

산 촉매를 첨가한 증기 폭쇄 기술 개발도 많이 이루어져 왔다. 산을 사용하게 되면 장치의 부식을 야기시키고 반응 부산물의 양이 늘어난다는 단점이 있지만, 그럼에도 불구하고 산 촉매에 의해 헤미셀룰로오스의 가수분해와 용해가 가속화되므로 반응 온도를 낮출 수 있고 부분적인 셀룰로오스의 가수분해를 일으켜 당화율을 향상시킬 수 있다는 장점이 있다[42, 43]. 특히 황산 촉매를 이용한 증기 폭쇄는 무촉매 증기폭쇄의 효과가 그다지 크지 않은 침엽수를 전처리할 때 매우 효과적인 것으로 보고되었다[42].

증기 폭쇄는 전처리에 걸리는 시간이 비교적 짧고 (수 분 이내) 헤미셀룰로오스의 제거에 유리하다는 장점이 있다. 그러나 당화 저해 물질의 생성과 상대적으로 고온 (160~260 °C) 이 필요한 점은 극복해야 할 과제이다.

## 아임계수 처리 (Subcritical water pretreatment)

아임계수 전처리는 흔히 열수 전처리(hot compressed water pretreatment)로 불리기도 하는데 다른 촉매나 화학물질을 첨가하지 않고 오직 물만을 이용하며, 증기 폭쇄와는 달리 빠른 감압 공정이 없다는 특징이 있다[11]. 아임계수 전처리는 일반적으로 160~240 °C 정도의 온도에서 이루어지며 물의 액상을 유지하기 위해 높은 압력이 가해진다. 증기 폭쇄와 마찬가지로 주로 헤미셀룰로오스의 가수분해를 통한 제거를 목표로 하며 조건에 따라 다르지만 일반적으로 약 80% 이상의 헤미셀룰로오스 제거율을 보인다. 아임계수의 기본적인 반응 기작은 약산 가수분해 또는 증기 폭쇄와 매우 유사한 형태를 나타낸다. 지금까지 다양한 종류의 섬유소계 바이오매스에 대해 아임계수 전처리 연구가 이루어졌는데 왕겨[44], 밀짚[45, 46], 벼짚[47], 유칼립투스[48], 기름야자 잎[49] 등을 포함한다.

아임계수 전처리는 다른 화학물질을 첨가하지 않으므로 촉매나 내부식성 소재의 사용에 따른 비용을 절감할 수 있고 대부분의 헤미셀룰로오스를 제거할 수 있다는 장점이 있다. 또한 고상 물질을 함유한 슬러리의 이송 문제만 해결된다면 연속식으로 제작하기에 적합한 공정이다. 증기 폭쇄와 비교해 당의 회수율이 높으며 발효 저해 물질의 생성도 적은 편이다. 그러나 상대적으로 고온, 고압의 운전 조건으로 인해 초기 장치 비용과 운전 비용이 많이 드는 점은 극복해야 할 과제이다.

### 암모니아 폭쇄 (Ammonia fiber explosion, AFEX)

암모니아 폭쇄 공정은 미시간주립대학교의 Dale 등이 제안한 방법으로 먼저 고온, 고압 조건에서 바이오매스를 액상의 무수 암모니아에 노출시킨다. 일정 반응 시간이 지나면 순간적인 감압이 이루어지면서 암모니아의 기화가 일어나는데, 이 영향으로 인해 셀룰로오스 섬유 구조의 팽윤과 같은 물리적 변화가 일어난다. 증기 폭쇄나 아임계수 전처리와 같은 다른 전처리 공정은 전처리 후 발생하는 슬러리를 액상과 고상으로 분리하여야 하나 암모니아 폭쇄에서는 오직 고상 시료만이 얻어진다[11].

암모니아 폭쇄는 셀룰로오스를 팽윤시켜 결정성을 떨어뜨림과 동시에 리그닌과 탄수화물 사이의 결합을 약화시키는데 영향을 주는 것으로 보고되고 있다[50]. 따라서 흡수력이 증가하고 효소에 의한 당화율이 높아져 당의 회수가 용이해진다[51]. 이 공정의 또다른 장점으로는 리그닌 제거에 효과적인 점, 부산물의 생성이 적은 점, 전처리 후 대부분의 탄수화물이 온전하게 보존된다는 점을 들 수 있다. 그러나 고온, 고압의 암모니아를 사용하는데 따른 안전성의 문제와 운전 비용을 줄이기 위한 암모니아의 회수 문제를 반드시 고려하여야 한다[52].

## 2. 1 단계: 아임계수 전처리를 통한 헤미셀룰로오스의 분획

### 2.1. 서론

앞 절에서도 언급했듯이 아임계수 전처리법은 물만을 용매로 이용하므로 환경 부담이 상대적으로 적고 헤미셀룰로오스를 제거하는데 장점을 가지고 있어 이전부터 많은 연구가 이루어져 왔다. 따라서 본 연구에서는 섬유소계 바이오매스의 주요 성분을 분획하기 위한 첫 단계 공정으로서 아임계수 전처리를 선택하였다. 이 공정에서는 특히 반응 온도와 체류 시간이 전처리 결과와 뒤따르는 당화 및 발효 공정에 영향을 미치는 가장 중요한 공정 변수로 인식되어 왔다. 1987 년 Overend 와 Chronet 이 두 공정 변수를 하나의 인자로 묶은 반응 좌표(reaction ordinate)의 개념을 처음으로 증기 폭쇄에 도입한 이래 많은 연구자들의 노력에 의해 가혹성 계수(severity factor)로 발전하였고, 다수의 연구자들이 이와 관련된 연구를 수행하여 왔다[53-55]. 그러나 전처리물의 물리화학적 성질과 당화에 대한 가혹성 계수의 영향을 종합적으로 분석한 예는 거의 없었다. 본 연구에서는 백합나무를 이용하여 아임계수 전처리와 당화를 실시하였고, 이때 반응 조건이 전처리물의 성질과 당화율에 어떤 영향을 주는지를 가혹성 계수를 이용하여 다각도에서 분석하였다.

### 2.1.1. 아임계수의 특징과 전처리 반응 기작

물은 지구상에서 가장 흔하며 인체와 환경에 해가 없는 물질이다. 또한 산업에서 가장 널리 이용되는 용매 중 하나이다. 상온, 상압의 물은 수소결합을 하고 있고 유전상수가 약 80 정도로 극성을 띠므로 전해질이나 극성 물질은 잘 녹이지만 극성이 약한 유기물은 거의 녹이지 못하므로 쓰임새에 다소 제한이 있다.

그러나 물의 온도와 압력을 변화시키면 그림 2-1 에 나타난 바와 같이 여러 가지 물성이 변하게 된다. 이러한 주 원인은 온도의 상승에 따른 물의 수소결합 상태의 변화 때문으로 해석된다[56]. 특히 임계점(374 °C, 221 bar) 이상의 초임계수가 되면 유전상수(dielectric constant) 나 이온곱(Ionic product) 농도가 극적으로 변하면서 상온의 물과는 전혀 다른 성질을 가지게 된다. 유전상수는 온도가 상승함에 따라 점점 감소하다가 임계점 근처에서 급격히 떨어지게 되고 400 °C, 300 bar 정도의 초임계 상태에서는 약 6 까지 떨어진다고 알려져 있다[57]. 이는 헥산과 같은 비극성 용매와 비슷한 수준으로 상온에서는 녹이지 못하던 여러 가지 비극성 물질들에 대한 용해도를 가지게 됨을 의미한다. 이온곱 농도는 약 250 °C 부근까지 증가하다가 점점 감소하며, 초임계 상태가 되면 급격히 감소하는 경향을 보인다. 따라서 초임계 상태보다는 아임계 상태일 때 이온 반응에 더 유리함을 알 수 있다. 그러나 초임계 상태에서는 강력한 라디칼 반응장을 이루며 물 자체의 산화력이 매우 강해지기 때문에 산화반응에 매우 유리하여 여러 가지 산화 반응에 이용되고 있다[58, 59]. 그러나 섬유소계 바이오매스를 전처리하는 경우 매우 짧은 반응 시간에도 대부분의

성분이 분해되며, 셀룰로오스가 분해되었을 때 포도당에 대한 선택성도 높지 않은 것으로 알려져 있다[60, 61].

아임계수에 대한 정의는 연구자마다 조금씩 다르나 많은 경우 끓는점 이상, 임계점 이하의 온도에서의 물을 아임계수로 정의하는 경우가 많다[62]. 그림 2-1 과 같이 아임계수는 이온곱 농도를 제외하고는 대체로 상온 및 초임계 상태의 물의 중간 정도의 성질을 보인다. 상온이나 초임계 상태의 물에 비해 높은  $H^+$ 와  $OH^-$ 이온 농도는 가수분해와 같은 산 또는 염기 촉매 반응을 가속시키는 역할을 한다[63]. 셀룰로오스는 분자간 수소결합과 그에 따른 결정성으로 인해 가수분해에 대한 저항성이 큰 편이다. 따라서 아임계수는 분자량이 작고 가지 구조로 인해 결정성이 낮은 헤미셀룰로오스만을 선택적으로 가수분해하여 분리함에 있어 초임계수에 비해 유리한 점을 가지고 있다.

아임계수 전처리의 반응 기작은 다음과 같이 알려져 있다[64]. 먼저 아임계수의 자기가수분해(autohydrolysis)에 의해 헤미셀룰로오스 말단에 붙어있는 아세틸기 또는 유론기 등이 떨어져 나와 유기산이 형성된다. 일단 해리된 유기산은 반응장 내의 pH 를 더 낮추는 역할을 할 뿐만 아니라 산 촉매로서도 작용한다. 따라서 섬유소계 바이오매스의 각 성분, 특히 헤미셀룰로오스와 일부 리그닌의 가수분해와 용해를 촉진시키는 역할을 하는데 이는 약산 가수분해법의 반응 기작과 상당히 유사하다.

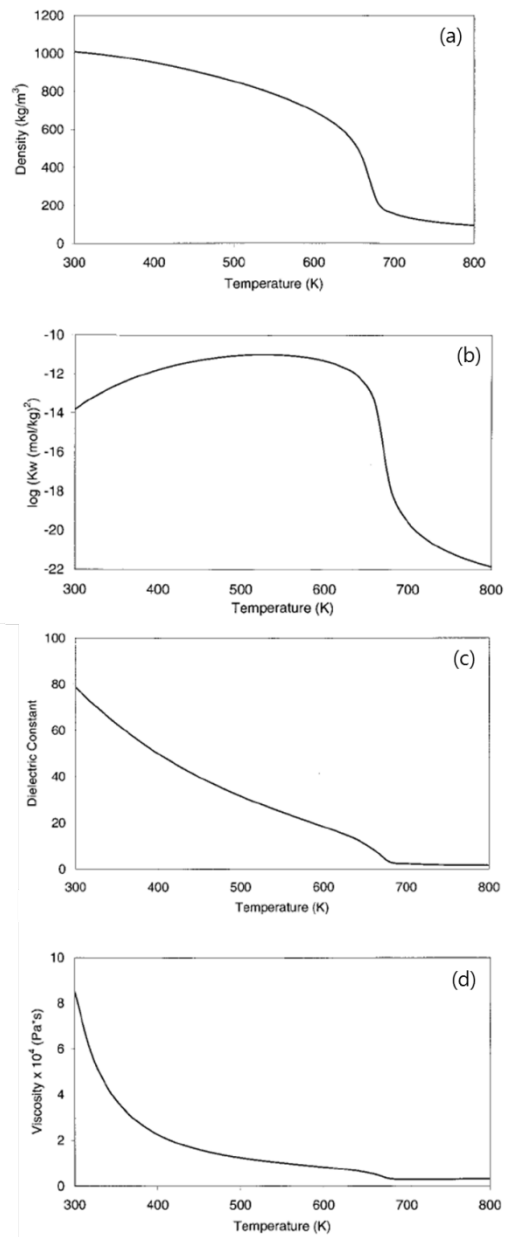


그림 2-1. 280 bar 의 압력에서 온도 변화에 따른 물의 성질 변화.

(a) 밀도 (b) 이온곱 농도 (c) 유전상수 (d) 점도 [65]

### 2.1.2. 가혹성 계수 (Severity factor)

아임계수 전처리를 비롯한 수열 반응에 있어서 반응 온도와 체류 시간은 반응의 전환율이나 수율에 가장 큰 영향을 미치는 변수들이다. 산이나 알칼리 등의 촉매를 사용하는 경우 반응 용액의 pH 도 중요한 변수가 되나 여기서는 다른 첨가물이나 촉매를 사용하지 않으므로 고려하지 않기로 한다. 같은 온도에서 시간을 얼마나 달리 했는지 또는 같은 시간 동안 얼마나 다른 온도에서 처리했는지에 따라 그 반응의 결과가 달라지며, 다른 온도와 시간 동안 전처리 했어도 비슷한 결과를 얻는 경우도 있다. 따라서 두 변수를 하나로 묶어 한꺼번에 고려한다면 전체적인 전처리의 반응 기작을 이해하기 더 쉬워지며, 나아가 공정을 설계하는데 있어서도 유용한 정보를 제공할 수 있다.

이러한 노력은 이미 1900 년대 중반부터 펄프 및 제지 학계를 중심으로 이루어져 왔다. Brasch 와 Free[66]는 P 계수(P factor) 의 개념을 도입하였고, Sjöström 은 이를 발전시켜 시간에 대한 반응 속도의 비인 H 계수(H factor) 를 도입하였다. Overend 와 Chronet[53]은 이를 바탕으로 섬유소계 바이오매스의 전처리에 적용하여 오늘날 대부분의 연구자들이 전처리의 반응 정도를 평가하는데 사용하고 있는 가혹도(severity)를 정의하고 가혹성 계수로 나타내었다. 가혹성 계수는 당초 전처리 조건에 따른 헤미셀룰로오스의 분해 정도를 계산하기 위하여 도입되었으나 전처리 후의 무게 변화 및 여러 가지 반응 생성물의 수율, 중합도, 효소 당화율, 화학 조성 변화 등 전처리 전후 발생하는 여러 가지 다른 현상을 분석하는데도 유용하게 쓰일 수 있다는 것이 밝혀졌다[55, 67].



몇 가지 가정으로부터 가혹성 계수를 구할 수 있다. 우선 전처리 반응은 한 단계로 이루어진 1 차 비가역 반응이다. 또한 반응은 아레니우스 온도 의존성을 가진다. 이로부터 전처리 온도에서의 반응 속도와 기준 온도에서의 반응 속도의 비를 구하면 가혹성 계수의 식을 얻을 수 있다.

$$R_0 = \int_0^t \frac{k}{k_r} dt = \exp\left(\frac{T - T_r}{\omega}\right) t$$

이때  $t$  는 반응 시간(min),  $k$  는 전처리 온도에서의 반응 속도 상수,  $k_r$  은 기준 온도에서의 반응 속도 상수,  $T$  는 전처리 온도(°C),  $T_r$  은 기준 온도(100 °C),  $\omega$  는 기준 온도에서의 활성화 에너지와 관련된 상수로 대부분의 경우 14.75 를 사용한다. 따라서 주어진 상수값을 대입하여 다시 정리하면 다음과 같다.

$$R_0 = t \times \exp\left(\frac{T - 100}{14.75}\right)$$

이처럼 주어진 온도와 시간을 알면 전처리 반응의 가혹성 계수  $R_0$  를 계산할 수 있는데, 이 값은 그대로 사용하지 않고 로그를 취한 값을 이용한다. 본 논문에서 가혹성 계수를 언급할 때는 모두  $\log R_0$  의 값을 사용하였다.

## 2.2. 재료 및 장치

### 2.2.1. 원료의 선정

전처리 공정이 경제성을 가지기 위해서는 다양한 종류의 섬유소계 바이오매스에 대해 범용적인 적용이 가능해야 한다. 그러나 개발하고자 하는 전처리 공정에 대해 수많은 종류의 바이오매스를 모두 적용해 보기에는 여러 가지 제약이 따르므로 본 연구에서는 한 가지의 원료를 정하여 실험에 이용하였다. 그러나 섬유소계 바이오매스의 경우 같은 종이라도 원료의 수확 시기나 생산 지역, 사용된 부위 등에 따라 그 화학적 조성에 편차가 생길 수 있다는 한계가 있으므로, 연구를 목적으로 하는 경우는 가급적 한번에 충분한 원료를 확보하여 앞에서 언급한 영향을 최소화할 필요가 있다.

본 연구에서는 국내에서 입수 가능한 섬유소계 바이오매스 중 목질계인 백합나무(영문명: tulip tree, 학명: *Liriodendron tulipifera*)를 원료로 선정하였다. 백합나무는 북아메리카가 원산지인 활엽수로서 튕립의 모양을 닮은 꽃의 생김새 때문에 튕립나무로 불리기도 하나 실제로는 목련과에 속하는 나무이며, 잎은 네 갈래로 나뉘어진 모양을 하고 있다(그림 2-2). 백합나무는 여러 가지 특성으로 인해 경제림 육성에 적합한 수종으로 평가되고 있는데, 그 이유는 성장 속도가 다른 경제 수종에 비해 빠르다는 점, 병충해에 대한 저항성이 높다는 점, 이산화탄소 흡수량이 타 수종에 비해 많다는 점, 밀원으로서의 가치가 높다는 점 등이 있다. 산림청에서도 이러한 특징들을 고려하여 백합나무를 경제림 조성을 위한 조림 권장 수종으로 지정하였으며

현재는 주로 기후 조건이 잘 맞는 중부 이남지방에서 조림되고 있다. 국내의 대표적인 조림지로는 전남 강진군의 초당림을 들 수 있다.

백합나무는 특히 목질을 구성하는 당 성분의 함량이 다른 수종과 비교하여 높기 때문에 그 활용도가 높다고 할 수 있다. 이것의 확인을 위해 국내에서 입수 가능한 수종 중 활엽수 1 종, 침엽수 2 종을 더하여 총 4 종류의 수종을 선정하였다. 비교 대상이 될 활엽수로는 참나무(영문명: oak, 학명: *Quercus*)를 선정하였고, 침엽수로는 소나무(영문명: Japanese red pine, 학명: *Pinus densiflora*)와 낙엽송(영문명: Japanese larch, 학명: *Larix kaempferi*)을 선정하였다. 각 수종의 화학적 조성 분석은 미국 국립재생에너지연구소(National Renewable Energy Laboratory, NREL)에서 제공하는 표준 분석법(Laboratory Analytical Procedure, LAP)[68-70]에 따라 진행하였으며 그 결과를 표 2-1 에 나타내었다. 알파셀룰로오스의 함량만 놓고 보면 소나무가 백합나무에 비해 다소 우세하나 알파셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 총칭하는 홀로셀룰로오스의 양을 비교해 보면 76.90% 대 72.08%로 백합나무의 총 당 함량이 높은 것을 알 수 있다. 또한 표 2-2 에서 보듯이 당화 및 발효의 주요 표적이 되는 전체 글루칸의 함량은 백합나무에서 44.84%로 가장 높게 측정되었다.

실험에 이용된 백합나무는 다양한 크기를 가진 목분의 형태로 뉴트라팜(주)으로부터 공급받았다. 입수한 백합나무 목분은 추가적인 분쇄와 분체 과정을 거쳐 최종적으로 0.25~0.42 mm 의 크기를 가지는 입자만을 실험에 사용하였다. 추가적으로 속실텟 장치를 이용하여 지질이나 클로로필 등 후속 분석 과정의 방해 요소가 될 수 있는

물질들을 추출하였다[69]. 용매로는 에탄올과 벤젠을 1:2 의 부피비로 섞은 용액을 이용하였으며, 약 12 시간 동안 추출을 진행하였다. 이렇게 얻은 탈지 시료는 유기용매의 제거를 위해 45 °C 의 진공 오븐에서 건조하였다. 건조가 끝난 탈지 시료는 실험에 사용되기 전까지 상온의 데시케이터에 보관하였고 평균 함수율은 5% 이내로 유지하였다. 향후 사용되는 용어 중 전처리하기 전 백합나무는 건조된 백합나무 탈지 시료를 칭하는 말로 쓰였다.



그림 2-2. 백합나무의 전체적인 모습(좌)과 꽃(중) 및 잎(우)의 생김새.

표 2-1. 각 수종의 화학적 조성 분포 (단위: %)

	백합나무	참나무	소나무	낙엽송
알파셀룰로오스 ( $\alpha$ -cellulose)	41.63	39.54	42.57	39.49
헤미셀룰로오스 (hemicellulose)	35.27	28.65	29.51	27.02
산 가용성 리그닌 (acid-soluble lignin)	5.34	7.03	3.85	3.33
산 불용성 리그닌 (acid-insoluble lignin)	20.06	26.32	21.33	27.03
추출물 (extractives)	2.31	3.50	4.15	3.54
회분 (ash)	0.67	1.69	0.47	0.43

표 2-2. 각 수종에 함유된 글루칸 함량

	백합나무	참나무	소나무	낙엽송
글루칸 (glucan)	44.84	38.87	43.95	37.04

### 2.2.2. 실험 장치

아임계수 전처리는 회분식 반응 시스템을 이용하여 진행되었다. 그림 2-3 에 나타난 바와 같이 실험에 쓰인 회분식 반응기는 한양정밀을 통해 주문 제작하였으며, 내부 부피는 23.6 ml 로 측정되었다. 반응기의 두께는 고압의 환경에 적합하도록 설계되었으며, 반응기 재질로는 비교적 부식에 강한 316 형 스테인리스 강을 이용하였다.

반응기에 열을 공급하고 온도를 유지하기 위한 장치로 그림 2-4 에 나타난 것과 같은 용융염조(molten salt bath) 를 대풍 인더스트리에서 주문 제작하여 사용하였다. 용융염조의 유효 온도 범위는 염조 내부를 채우는 염의 종류와 비율에 따라 달라진다. 본 실험에서는  $\text{Na}(\text{NO})_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO})_3$  를 각각 7:45:48 의 무게 비로 혼합하여 이용하였으며, 이 경우 사용 가능한 온도 범위는 120~500 °C가 된다[71]. 용융염조 내부의 온도 측정을 위해 수위에 따라 3 개의 K 형 열전쌍을 설치하였고, PID(proportional integral derivative) 방식의 온도 조절기를 이용하여 온도를 조절하였다. 교반 효과를 주기 위해 용융염조의 상단에는 좌우로 왕복운동을 하는 교반기를 설치하였고, 실험시에는 1 분에 약 47 회의 왕복 운동을 하도록 속도를 설정하였다. 반응기는 한 번에 두 개의 반응기를 놓을 수 있는 거치대에 장착되며, 반응기가 장착된 거치대는 다시 교반기에 연결하여 교반기의 왕복 운동을 반응기에 전달한다.



그림 2-3. 실험에 사용된 회분식 반응기.



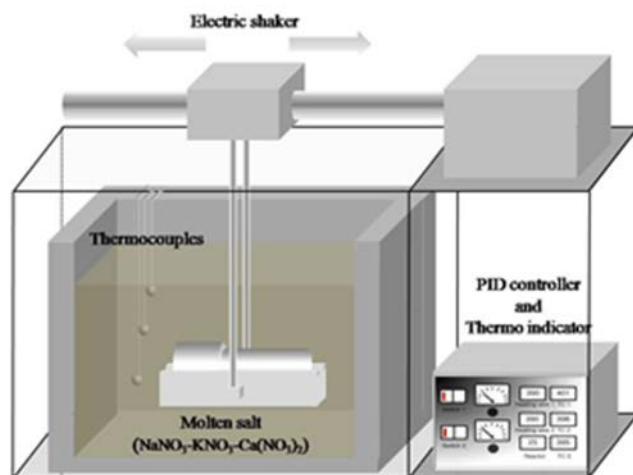


그림 2-4. 실험에 사용된 용융염조의 모식도(상) 및 실제 모습(하).

## 2.3. 실험 및 분석

### 2.3.1. 아임계수 전처리

회분식 반응 시스템에서의 아임계수 전처리 실험은 다음과 같이 진행되었다. 먼저 일정한 양의 백합나무 목분과 증류수를 반응기에 주입하고 밀폐하였다. 이때 물과 바이오매스의 무게 비는 모든 반응 조건에서 1:15 가 되도록 일정하게 유지하였다. 일반적인 경우 반응물이나 용매의 투입량을 결정함에 있어 설계 온도와 압력을 고려하여 계산하여야 한다. 그러나 본 실험에서는 모든 실험 조건에 대해 일정한 양의 물과 바이오매스를 넣어주었다. 설계온도에서 물의 밀도를 0.7 g/ml 로 고정시켜 계산하면 약 16.52 g 의 물을 넣어주어야 한다. 이에 따른 바이오매스의 투입량은 약 1.3 g 이 된다. 이 경우 주어진 반응 온도에서 반응기 내부의 압력은 온도에 따라 달라지게 되지만 본 실험에서는 압력이 반응 결과에 미치는 영향은 매우 적다고 가정하였다.

밀폐된 반응기는 설계 온도로 미리 가열되어 있는 용융염조에 투입하고 약 30 s 간 반응기가 새지 않는지 지켜본 후 교반기를 작동시켰다. 미리 열전쌍을 연결한 반응기를 용융염조에 넣은 후 교반해 주면서 반응기 내부의 온도가 설계 온도까지 도달하는데 걸리는 시간을 측정해본 결과 승온 시간은 모든 온도에서 150 s 로 측정되었다. 설계 온도에 이르는 시간 동안 가수분해 등의 반응이 진행될 수 있지만 본 실험에서는 승온 시간 동안에는 반응이 진행되지 않는 것으로 가정하고 반응기 내부의 온도가 설계 온도에 도달한 시점부터 반응기를

용융염조에서 꺼내는 시간까지를 체류 시간으로 정의하였다. 정해진 체류 시간에 도달하면 재빨리 거치대를 교반기로부터 분리하여 냉수조에 담귀 더 이상의 반응이 진행되는 것을 차단하였고 추가적으로 흐르는 물로 반응기를 씻어내어 반응기 외부에 잔류할 수도 있는 염을 제거해 주었다.

반응기가 상온으로 냉각되면 반응기의 뚜껑을 열고 반응 생성물들을 회수하였다. 반응 생성물들을 액상과 고상으로 분리하기 위해 유리 필터와 진공 펌프를 이용하였다. 반응 생성물들을 조심스럽게 1G4 유리필터(Iwaki, 일본)로 옮긴 후 진공을 걸어 액상과 고상을 일차적으로 분리하였다. 여기서 얻은 액상 가수분해물(liquid hydrolysate)은 따로 바이알에 옮겨 담아 후속 분석 과정에 이용하였다. 액상 가수분해물을 회수한 후 반응기 내부에 남은 반응 생성물들을 미리 80 °C 정도로 가열된 온수를 이용하여 행귀주면서 진공 여과시킨다. 이때 가수분해된 단당류나 저분자량의 올리고당, 유기산 등이 고상에 남아 있지 않도록 충분히 행귀주어야 하며, 최종적으로는 행귀낸 물의 pH 가 중성( $\text{pH} > 6$ )에 이를 때까지 진행하였다. 이렇게 얻어진 고상 시료는 건조시키지 않고 바로 효소 당화에 이용하였다. 추가적인 분석과 고상 수율, 당화율 등의 계산을 위해 시료의 일부를 털어내어 건조 전, 후의 무게를 측정함으로써 함수율을 계산하였다. 약간의 편차가 있으나 진공 여과와 세척 과정을 거친 젖은 고상 시료의 평균 함수율은 60% 로 측정되었다.

### 2.3.2. 효소 당화

전처리된 고상 시료의 효소 접근성을 알아보기 위하여 두 가지 종류의 상용 셀룰라아제를 이용하였는데, *Trichoderma reesei*로부터 얻은 Celluclast 1.5L(Sigma-Aldrich, 한국)와 *Aspergillus niger*로부터 얻은 Novozyme 188(Sigma-Aldrich, 한국)을 이용하였다(그림 2-5). 입수한 Celluclast 1.5L 과 Novozyme 188 의 활성은 알려진 방법에 따라 측정하였고, 각각  $339 \pm 43.6$  FPU/mL and  $241 \pm 8.7$  CBU/mL 로 분석되었다[72].

먼저 20 ml 의 바이알에 5 mM 의 시트르산나트륨(sodium citrate)버퍼 용액(pH 4.8) 9.6 ml 을 채우고 버퍼 용액 부피 대비 1%의 건조 무게에 해당하는 양의 시료를 넣어주었다. 당화가 이루어지는 동안 미생물의 성장으로 인한 당의 손실을 막기 위한 항생제로 2%의 아지드화나트륨(sodium azide) 용액 1 ml 을 첨가하였다. 나중에 효소를 넣었을 때 최종적으로 전체 부피가 10 ml 이 되도록 증류수를 첨가하여 조절하였다. 이때 먼저 넣어준 모든 물질의 부피는 1 g/ml 로 가정하여 계산하였다. 각 바이알을 50 °C로 미리 덩혀둔 배양기에 넣고 설정 온도에 이르기까지 약 1 h 동안 방치하였다. 바이알 내부의 온도가 50 °C에 이르면 준비된 효소를 첨가하는데 이때를 반응의 시작 시간으로 정하였다. Celluclast 1.5L 과 Novozyme 188 은 각각 10 FPU/g wet substrate 와 20 CBU/g wet substrate 에 해당하는 양을 넣어주었다. 효소를 넣은 시점으로부터 48 h 동안 150 rpm 의 속도로 교반시켜가며 당화를 진행하였다. 전체적인 효소 당화 조건은 표 2-3 에 요약하여 나타내었다.

분석을 위해 당화액으로부터 0.5 ml 의 시료를 채취하여 0.2  $\mu$ m 크기의 주사기 필터를 이용하여 여과시켰다. 여과시킨 용액은 바이알에 담겨 액체 크로마토그래피(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Inc., USA)로 정량 분석을 진행하였다. 당의 분석을 위해 굴절률(RI, refractive index) 검출기와 300 mm x 7.8 mm 크기의 Aminex HPX-87P 컬럼(Bio-Rad Laboratories Inc., USA)을 사용하였다. 분석 온도와 시간은 각각 80  $^{\circ}$ C, 30 min 이었고 이동상으로는 물을 0.6 ml/min 의 유량으로 흘려주었다.

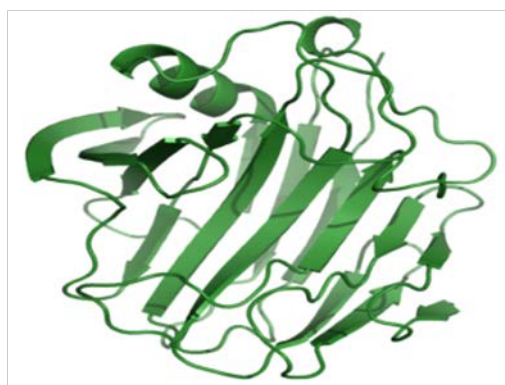
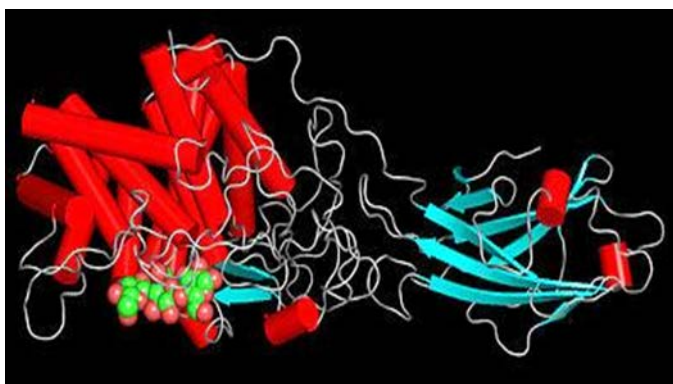


그림 2-5. Celluclast 1.5L(상)과 Novozyme 188(하)의 3 차원 분자  
구조 모식도.

표 2-3. 아임계수 전처리 고상 시료의 효소 당화 조건

Sample	Untreated and SCW pretreated TL solid (wet substrate)
Biomass loading	1% (oven dry wt. substrate/vol. of buffer)
Enzyme loading	Celluclast 1.5L: 10 FPU/g wet substrate Novozyme 188: 20 CBU/g wet substrate (CBU/FPU = 2:1)
Buffer solution	pH 4.8, 5mM sodium citrate buffer
Incubation temp.	50 °C
Shaking	150 rpm
Reaction time	48 h
Total volume	10 mL

### 2.3.3. 전처리 생성물의 분석

#### 고상 수율 (Solid yield)

먼저 시료에 포함되어 있는 수분을 제거하기 위하여 일정량의 시료를 미리 무게를 측정한 은박접시 위에 덜어 105 °C의 오븐에서 24 h 동안 건조시켰다. 건조된 시료를 오븐에서 꺼낸 후 바로 무게를 측정하면 공기 중의 수분이 다시 흡수되기 쉬우므로 영향을 최소화하기 위해 실온의 데시케이터에서 냉각한 후 무게를 측정하였다. 시료의 건조 전, 후의 무게를 알면 함수율을 구하여 오븐 건조 무게(oven dry weight, ODW) 를 알 수 있다.

고상 수율은 전처리 전의 바이오매스와 전처리 후에 얻어진 고상 시료의 오븐 건조 무게를 이용하여 아래의 식과 같이 계산할 수 있다.

$$\text{고상 수율 (\%)} = \frac{\text{아임계수 전처리된 고상 시료의 건조 무게 (g)}}{\text{아임계수 전처리 전의 백합나무 목분의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

#### 화학 조성 (Chemical composition)

전처리 전, 후 고상 시료의 화학 조성은 기본적으로 NREL 의 분석법[70] 을 따랐으나 일부 순서는 실험실의 환경에 맞게 수정하여 이용하였다. 먼저 건조된 시료 0.1 g 에 72% 황산 1ml 을 넣고 유리 막대로 잘 교반해주며 30 °C 온도의 항온수조에서 2 h 동안 가수분해 시킨다. 여기에 28 ml 의 증류수를 첨가하여 황산의 농도가 4%가 되도록 한 후 121 °C의 오토클레이브에서 1 h 동안 처리한다. 여기서 얻어진 가수분해 용액은 냉각시킨 후 1G4 유리 필터를 이용하여 진공 여과시킨다. 유리 필터에 남은 흑갈색의 고체 찌꺼기는 산 불용성



리그닌(acid-insoluble lignin 또는 Klason lignin)으로 105 °C의 오븐에서 24 h 동안 건조시킨 후 무게를 재어 그 양을 측정하였다. 산 불용성 리그닌의 함량은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{산 불용성 리그닌 함량 (\%)} = \frac{\text{필터에 남은 리그닌의 건조 무게 (g)}}{\text{가수분해 전 시료의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

산 가용성 리그닌(acid-soluble lignin)의 함량은 진공 여과 과정에서 미리 액상 가수분해물 여과액의 부피를 측정한 뒤 UV-Vis 분광기(Evloution 201, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)를 이용하여 240 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 구하였다. 이때 여과액의 흡광도가 0.7~1.0 사이가 되도록 증류수로 희석해 가면서 측정한다. 산 가용성 리그닌의 함량은 다음과 같은 식에 의해 구할 수 있다.

산 가용성 리그닌 함량 (%)

$$= \frac{\text{UV 흡광도} \times \text{여과액 부피 (ml)} \times \text{희석 배수}}{\epsilon \times \text{가수분해 전 시료의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

여기서  $\epsilon$ 은 특정 파장에서 바이오매스의 흡수능(absorptivity)을 의미하며 단위는 l/g cm 이다. 흡광 파장과 이에 따른 흡수능은 바이오매스의 종류에 따라 달라지는데 표 2-4 에 바이오매스의 종류에 따른 권장 파장과 그에 따른 흡수능을 나타내었다[70].

표 2-4. 산 가용성 리그닌 분석을 위한 바이오매스의 종류별 권장  
파장과 흡수능 값

바이오매스 종류	권장 파장 (nm)	권장 파장에서의 흡수능 (l/g cm)
라디아타 소나무	240	12
바가세	240	25
옥수수대	320	30
포플러	240	25

여과액의 일부는 가수분해되어 생성된 단당류와 유기산 등의 정량 분석에 사용되었다. 당과 유기산의 분석에는 HPLC 가 사용되었다 (Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Inc., USA). 검출기로는 굴절률(RI, refractive index) 검출기가 사용되었으며 300 mm x 7.8 mm 크기의 Aminex HPX-87P 컬럼과 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad Laboratories Inc., USA)이 각각 당과 유기산의 분석을 위해 사용되었다. 당 분석을 위해서는 물을 이동상으로 사용하였고 분석 온도와 시간은 각각 80 °C, 30 min 으로 하였다. 유기산 분석의 경우 이동상으로는 5 mM 황산 수용액을 사용하였고 60 °C의 온도에서 0.6 ml/min 의 유량으로 흘려주었다.

## X 선 회절 분석 (XRD)

Cu K $\alpha$  를 방사선원으로 하고 흑연 단색화 장치를 이용하는 일본 Rigaku 사의 X 선 회절 분석기를 이용하여 고상 시료의 결정성을 측정하였다. 회절 패턴은 10~40°의 2 $\theta$  범위에서 기록되었고, 1°/min 의 스캔 속도로 0.02°마다 측정하였다. 가동 전압과 가동 전류는 각각 50 kV 와 200 mA 로 하였다.

X 선 회절 분석의 결과를 이용하여 바이오매스의 결정화도 (crystallinity index, CrI)를 계산할 수 있다. CrI 는 Segal 등에 의해 최초로 제안된 방법으로 다른 분석 방법에 비해 비교적 간단하게 구할 수 있다는 장점이 있어 연구자들 사이에서 가장 널리 이용되고 있는 방법이다[73]. CrI 는 다음과 같은 식에 의해 계산할 수 있다.

$$\text{CrI (\%)} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100\%$$

여기서  $I_{002}$  는 바이오매스의 결정성 영역이 나타내는 피크의 세기로서  $2\theta = 22.0 \sim 22.4^\circ$ 의 범위에서 최대값을 나타내며,  $I_{am}$  은  $2\theta = 18.0^\circ$  부근에서 나타나는 바이오매스의 비결정성 영역에 의한 신호의 최소 세기를 의미한다. 바이오매스의 결정성은 주로 결정 형태의 셀룰로오스에 의해 좌우되고 나머지 비결정성 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등은 비결정성 영역을 이룬다. 따라서 CrI 는 이들 결정성 물질과 비결정성 물질의 상대적인 비율을 나타내는 척도로 이용할 수 있다.

#### 전계방출 주사전자현미경 (SEM)

전처리 전후의 바이오매스 표면 형태와 구조의 변화를 보기 위하여 전계방출 주사전자현미경(SUPRA 55VP, Carl Zeiss, Germany)을 이용한 관찰을 수행하였다. 건조된 고상 시료를 스테브에 미리 붙여둔 카본 테이프 위에 잘 펴 바르며 부착시켰다. 카본 테이프 위에 제대로 부착되지 않은 시료는 분석 시 기기를 손상시킬 수 있으므로 바람을 불어 날려주었다. 준비된 시료는 전도성을 부여하기 위해 백금 코팅을 한 후 기기에 넣고 다양한 배율로 표면을 관찰하였다.

## 2.4. 결과 및 고찰

### 2.4.1. 전처리 시료의 수율 및 조성 변화

각 아임계수 전처리 조건에 대한 가수분해 반응의 효율과 선택성을 알아보기 위해서 전처리된 고상 시료의 수율과 화학 조성을 분석하고 전처리하지 않은 백합나무 시료의 화학 조성과의 비교하였다. 전처리 온도와 체류 시간은 각각 180~220 °C, 1~30 min 으로 설정하였고, 이때의 전처리 가혹도(Log  $R_0$ ) 는 3.05 에서 5.01 의 범위를 나타내었다. 전처리하지 않은 시료와 각 실험 조건에 대한 고상 시료의 분석 결과를 표 2-5 에 정리하여 나타내었다.

고상 시료의 수율은 전처리 조건이 가혹해질수록 감소하는 경향을 나타냈다. 전처리하기 전의 고상 수율을 100%로 보았을 때, 가장 가혹한 220 °C, 30 min(Log  $R_0$  = 5.01) 의 전처리 조건에서는 전처리 후에 58.9%만이 고상의 형태로 얻어졌다. 이 조건에서는 어떠한 헤미셀룰로오스 구성 당(자일란, 갈락탄, 아라비난, 만난)이나 아세틸기도 검출되지 않았는데, 이는 백합나무로부터 헤미셀룰로오스 성분이 거의 완전하게 분리되었음을 의미한다. 전처리 조건에 따른 가수분해 거동 특성은 헤미셀룰로오스 구성 당의 종류에 따라 다른 양상을 보였다. 가수분해에 가장 취약한 것은 아라비난으로 3.52 이상의 가혹도에서 전부 가수분해되어 더 이상 검출되지 않았으며 그 뒤를 이어 갈락탄과 만난이 비슷한 정도의 가수분해 저항성을 보였다. 두 당의 경우 가혹성 계수가 높더라도 반응 시간이 짧은 경우(220 °C, 5 min)에는 소량의 당 성분이 검출되기도 하였다. 자일란은 상대적으로

아임계수 가수분해에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났는데 가혹성 계수가 4.83 에 이를 때까지 검출되는 것으로 나타났다.

글루칸과 산 불용성 리그닌의 함량은 전처리 조건이 가혹해짐에 따라 점점 증가하는 경향을 보였다. 즉, 헤미셀룰로오스나 산 가용성 리그닌이 가수분해되어 녹아 나감에 따라 상대적으로 고상 시료에서 차지하는 비율이 높아진 것이다. 이는 글루칸과 산 불용성 리그닌이 아임계수 가수분해에 대한 저항성을 가지고 있음을 의미한다. 이를 좀 더 구체적으로 확인하기 위하여 그림 2-6 에 아임계수 전처리 조건에 따른 섬유소계 바이오매스 주요 성분의 제거 수율을 도시하였다. 그림에 잘 나와있듯이 아임계수 전처리는 헤미셀룰로오스 성분의 제거에 지대한 영향을 주는 것을 확인할 수 있다. 헤미셀룰로오스의 제거 수율 곡선은 전체적으로 가혹성 계수에 따라 밀접하게 의존하는 경향을 보이는 반면, 셀룰로오스의 제거 수율은 가혹성 계수에 따라 크게 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 반응의 가혹성 여부와 상관없이 전체적인 셀룰로오스의 제거 수율은 20% 이내로 관찰되었다. 이러한 결과는 이전의 연구에서도 보고된 바 있다[74-76]. 가혹성 계수에 따라 셀룰로오스의 제거 수율이 크게 변하지 않는 이유는 비결정성의 셀룰로오스가 결정성 셀룰로오스에 비해 상대적으로 낮은 온도에서 물에 용해된다는 사실로부터 찾을 수 있다[77]. 즉, 비결정성 셀룰로오스는 헤미셀룰로오스와 마찬가지로 아임계수의 공격에 대해 취약하며 이에 다른 용해 및 가수분해가 일어나기 쉽다.

한편 리그닌의 제거 수율 곡선은 가혹도에 따라 점점 증가하다가 일정 가혹도 이상에서는 다시 감소하는 경향을 보였다. 이는 반응이 진행되는 동안 생성되는 유사리그닌(pseudolignin)으로 설명할 수 있다.

유사리그닌의 생성 조건과 기작에 대해서는 몇몇 연구자들이 보고한 바가 있으며 주로 약산 가수분해나 아임계수 전처리, 증기 폭쇄와 같이 산성 조건에서 행해지는 전처리 공정에서 발생하는 것으로 알려져 있다[28, 78, 79]. 전처리 과정 중에 생성된 다당류와 리그닌 분해 산물들이 서로 탈수, 축합 등의 반응을 통해 고분자를 형성하게 되고 이것이 바이오매스 표면에 침전하게 된다. 이러한 고분자화된 침전물들이 고상 시료의 분석 과정에서 황산에 가수분해되지 않고 남아 산 불용성 리그닌의 함량을 계산하는데 포함된다. 결국 표 2-5 에 나타난 것과 같이 산 가용성 리그닌의 함량은 전처리 가혹도에 따라 감소하는 반면, 바이오매스 표면에 침전되는 유사리그닌은 결과적으로 산 불용성 리그닌의 함량을 증가시키는 결과를 가져온다.

표 2-5. 아임계수 전처리 전, 후 고상 시료의 고상 수율과 화학 조성

번호	온도 (°C)	체류시간 (min)	가혹도 (Log $R_\theta$ )	고상 수율 (%)	화학 조성 (%)							
					Glu	Xyl	Gal	Ara	Man	AG	KL	ASL
Control	–	–	–	100	37.9	17.0	4.9	1.9	2.0	0.5	20.7	5.6
1	180	5	3.05	89.3	35.5	15.2	4.3	0.4	1.2	0.4	18.8	3.8
2	180	10	3.36	84.4	40.0	14.6	4.7	0.3	1.1	0.3	18.3	3.4
3	180	15	3.52	74.3	43.5	12.1	5.7	nd	1.1	0.2	21.4	3.3
4	180	20	3.66	72.6	44.4	9.3	4.7	nd	1.1	0.2	22.2	3.2
5	180	30	3.83	69.0	47.2	8.6	4.7	nd	1.1	0.2	23.3	3.2
6	200	5	3.64	73.5	46.1	11.8	nd	nd	nd	0.3	20.3	3.9
7	200	10	3.94	65.7	50.0	5.6	nd	nd	nd	0.3	22.4	3.3
8	200	15	4.12	63.6	53.9	5.3	nd	nd	nd	0.0	23.6	3.2
9	200	20	4.24	62.8	56.5	4.5	nd	nd	nd	0.0	25.8	3.3
10	200	30	4.42	62.6	58.1	4.8	nd	nd	nd	0.0	26.7	3.3
11	220	5	4.23	62.7	56.1	3.3	2.1	nd	0.2	0.1	23.5	2.2
12	220	10	4.53	60.8	53.9	1.7	nd	nd	nd	nd	27.4	2.3
13	220	15	4.71	60.6	56.2	1.6	nd	nd	nd	0.1	28.5	2.4
14	220	20	4.83	61.0	56.7	1.4	nd	nd	nd	0.1	32.8	2.5
15	220	30	5.01	58.9	54.9	nd	nd	nd	nd	nd	33.7	2.5

nd = 검출되지 않음, Glu = Glucan (글루칸), Xyl = Xylan (자일란), Gal = Galactan (갈락탄), Ara = Arabian (아라비난), Man = Mannan (만난), AG = Acetyl group (아세틸기), KL = Klason lignin (산 불용성 리그닌), ASL = Acid soluble lignin (산 가용성 리그닌)



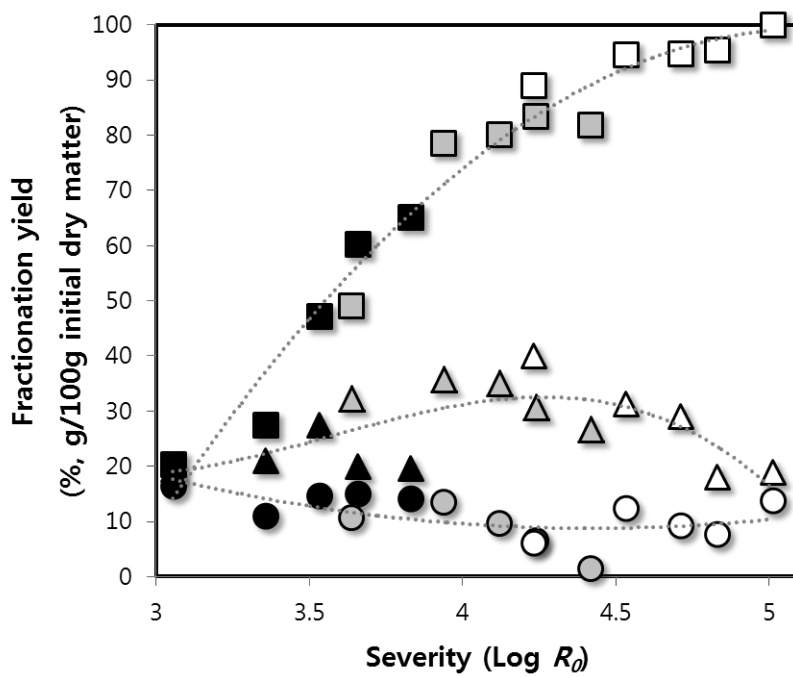


그림 2-6. 전처리 가혹도에 따른 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 분획 수율

#### 2.4.2. 전처리 시료의 물리화학적 특성 변화

전처리 가혹도에 따라 시료의 물리화학적 특성에 어떤 변화가 있는지를 알아보기 위하여 우선 고상 시료의 표면에 대한 분석을 실시하였다. 선별된 전처리 조건에 따른 SEM 분석 결과를 전처리하지 않은 백합나무의 표면 분석 결과와 비교하였다(그림 2-7).

그림 2-7a 에 백합나무의 미세구조를 3,000 배 확대하여 나타내었다. 식물체의 미세구조상 특징적인 부분은 표면에 존재하는 다수의 기공인데 전처리하기 전의 백합나무 표면에서는 대부분 닫혀있거나 표면에 금이 간 형태로 관찰되었다. 또한 다수의 미세 입자들이 표면에 존재하고 있는 것을 확인할 수 있다. 이것을 온도, 시간은 서로 다르지만 비슷한 가혹성 계수( $\text{Log } R_0 = 3.64 \sim 3.66$ )를 가지는 두 가지 조건에서 전처리한 백합나무 고상 시료와 비교하였다(그림 2-7b, c). 전처리하기 전과 비교하면 표면에 있던 미세입자들이 사라져 전체적으로 매끈해진 것을 확인할 수 있다. 또한 전처리하기 전에는 기공이 대부분 막힌 형태로 관찰되었는데 전처리 후에는 일부분 또는 전체가 열린 기공들이 다수 관찰되었다. 이는 헤미셀룰로오스나 일부 리그닌 성분이 아임계수에 용해되어 사라졌기 때문으로 해석할 수 있다.

좀 더 가혹한 조건에서의 표면 변화를 관찰하기 위해 약 4.2 정도의 가혹도를 가지는 두 가지 반응 조건에서 전처리한 고상 시료를 분석하였다(그림 2-7d, e). 관찰 결과, 두 조건 모두에서 기공의 확대와 미세 구조의 붕괴가 진행되고 있음을 확인하였다. 특히 할만한 점은 3.6 정도의 가혹도에서 매우 깨끗했던 표면에 다시 둥근 형태의 미세 입자들이 침전하는 것이 관찰되었다는 것이다. 이는 앞에서도

언급했듯이 아임계수에 녹은 리그닌과 당 분해 산물들이 다시 중합한 유사리그닌이 바이오매스 표면에 침전되었기 때문이다. Hashaikh 등[80] 역시 180 °C에서 아임계수에 대한 리그닌의 용해를 관찰하였고, 200 °C 이상에서는 용해된 리그닌이 다시 침전하는 현상을 관찰한 바 있다. 앞선 연구에서는 온도만을 변화시켜가면서 리그닌의 용해 거동을 관찰하였지만 본 연구에서는 같은 가혹도 조건에서 비슷한 현상이 발견됨을 보임으로써 리그닌의 용해 및 침전 정도가 단지 온도만에 의존하지 않고 반응 시간과도 복합적으로 관계됨을 확인하였다.

한편 전처리의 가혹도가 더욱 증가함에 따라 생성된 리그닌의 입자 크기도 증가하는 것을 그림 2-7f 를 통해 알 수 있었다. 입자의 크기가 증가함에 따라 입자의 모양도 구형(그림 2-7d-ii)에서 타원형으로 변하는 것이 관찰되었다. 이러한 유사리그닌 입자의 침전은 앞에서 언급했던 전처리 조건에 따른 리그닌 제거 수율 감소를 잘 설명해준다. 한편 이렇게 생성되어 바이오매스 표면에 침전된 유사리그닌은 후속 효소당화 공정에서 효소 활성을 저해하는 요인이 되는 것으로 알려져 있다. 특히 효소의 농도가 낮은 경우, 리그닌과 효소간의 불필요한 결합 및 효소 접근 표면적 감소로 인해 효소 당화율이 현저하게 감소하는 것으로 알려져 있다[81, 82]. 이를 극복하기 위해서는 상대적으로 높은 효소 농도가 요구되므로 경제성을 확보하는데 있어 어려움이 생기게 된다. 따라서 생성된 유사리그닌이 바이오매스 표면에 침전되는 것을 최소화하기 위한 공정의 개선이 요구된다.

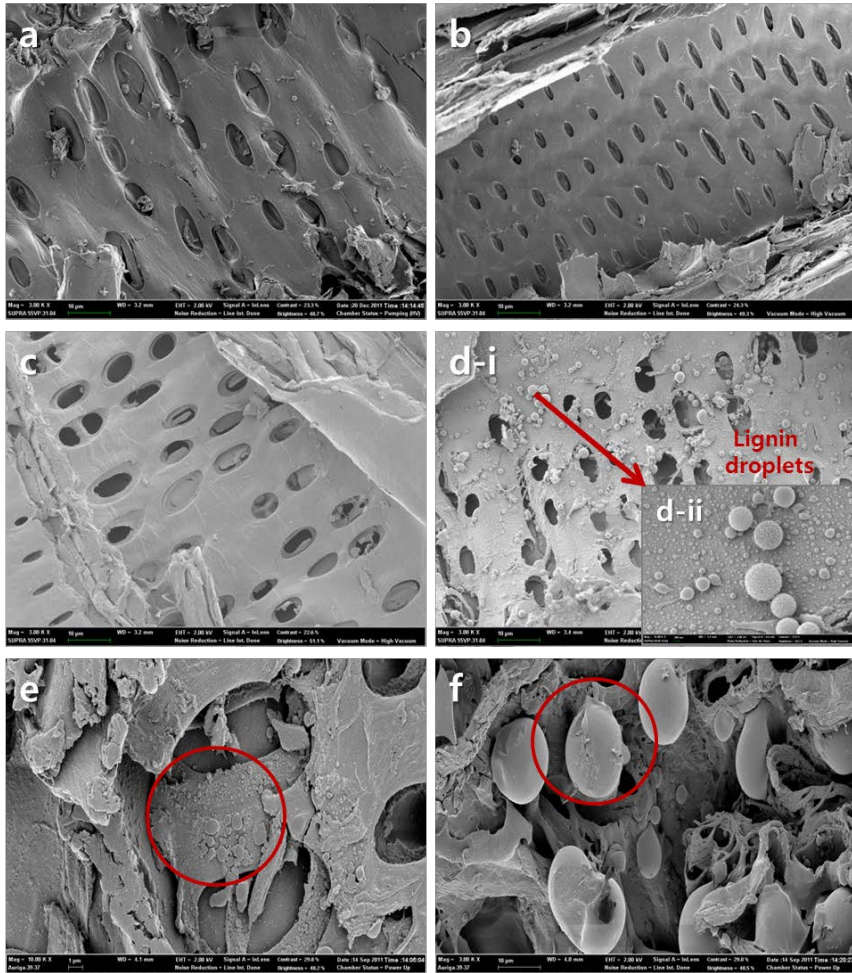


그림 2-7. 아임계수 전처리 전후의 바이오매스 표면 특성 비교.

- a. 전처리하지 않은 백합나무 표면, 3,000 배
- b. 180 °C, 20 min( $\text{Log } R_0 = 3.66$ ), 3,000 배
- c. 200 °C, 5 min( $\text{Log } R_0 = 3.64$ ), 3,000 배
- d-i. 200 °C, 20 min( $\text{Log } R_0 = 4.24$ ), 3,000 배 (d-ii. 35,000 배)
- e. 220 °C, 5 min( $\text{Log } R_0 = 4.23$ ), 10,000 배
- f. 220 °C, 15 min( $\text{Log } R_0 = 4.71$ ), 3,000 배

아임계수 전처리 전후 고상 시료의 색상 변화를 그림 2-8 에 나타내었다. 전처리 하기 전 백합나무 시료의 색깔은 연한 베이지색을 띠고 있다. 아임계수 전처리 후 고상 시료의 색은 가혹도가 증가함에 따라 점점 짙은 갈색을 띠는 것이 관찰되었고, 가혹성 계수와 전처리 시료의 색상 사이에도 밀접한 상관관계가 있음을 확인하였다. 이러한 색 변화가 일어나는 기작은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나 크게 몇 가지로 추측해볼 수 있다.

한 가지는 가수분해로 인해 생성된 단당류들이 높은 온도에서 카라멜화 반응(caramelization)을 일으키기 때문인데, 이는 액상 시료에서 HMF 가 검출된 것으로도 확인이 가능하다. 고온에서 당의 분해로 생성된 HMF 는 계속 산화하고 분열되어 반응성이 큰 물질들을 생성하고 이것들이 다시 축합 중합하여 짙은 색상을 띠는 휴민(humin) 물질들을 생성한다. 한편 환원당과 아미노산 사이의 반응으로 갈색의 질소화합물 색소를 형성하게 되는 마이야르 반응(Mailard reaction)은 상대적으로 가능성이 낮는데 이는 섬유소계 바이오매스 내에 단백질 함량이 매우 적을뿐더러 전처리 전에 이미 유기용매를 이용한 속실크 추출을 하였기 때문에 대부분의 단백질 또는 아미노산 성분은 제거되었기 때문이다.

또 다른 원인으로는 바이오매스 표면에 침전되는 유사리그닌을 고려할 수 있다. 이전 연구에서도 보고되었듯이 200~300 °C 범위에서 아임계수에 대한 섬유소계 바이오매스의 용해 거동을 관찰한 결과 헤미셀룰로오스와 리그닌으로부터 용해되어 나온 저분자 물질들이 이성질화, 탈수, 분해, 축중합 등 여러 형태의 복잡한 반응을 거쳐 고분자 형태의 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다[80]. 유사리그닌의

생성은 전체 반응을 구성하는 소반응들의 유사성으로 보아 카라멜화 반응과도 어느 정도 관련이 있는 것으로 보이나, 당 분해산물 뿐만 아니라 리그닌 분해 산물도 반응에 관여하므로 자세한 반응 기작을 이해하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

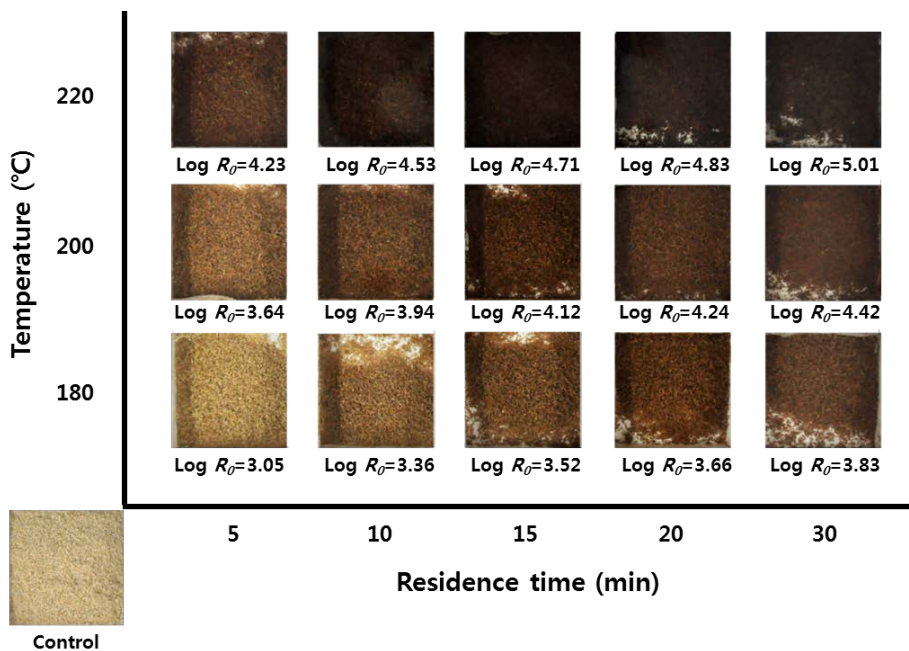


그림 2-8. 아임계수 전처리 전후 고상 시료의 색상 변화

바이오매스의 결정성은 당화 공정에서 효소의 소화율에 영향을 미치는 중요한 인자 중 하나이다[83]. 바이오매스의 결정화도(CrI)는 앞서도 언급했듯이 결정성과 비결정성 성분의 상대적 비율로 계산된다. 결정성은 셀룰로오스 원섬유의 사슬간 또는 사슬 내부의 수소 결합으로 인한 분자의 정렬로 인해 생기는 것으로 알려져 있으며 셀룰로오스의 일부와 나머지 다른 성분들은 분자간 결합 특성상 두드러진 결정성을 나타내지 않는다. 아임계수 전처리가 바이오매스의 결정화도에 미치는 영향과 상관관계를 알아보기 위하여 XRD 분석을 실시하였고 그 결과를 그림 2-9 에 나타내었다. 전처리하기 전과 비교하여 전처리 후에는  $22^\circ$  부근에서 나타나는 결정성 피크의 모양이 좀 더 뾰족해지고 폭도 좁아지는 것이 관찰되었다.

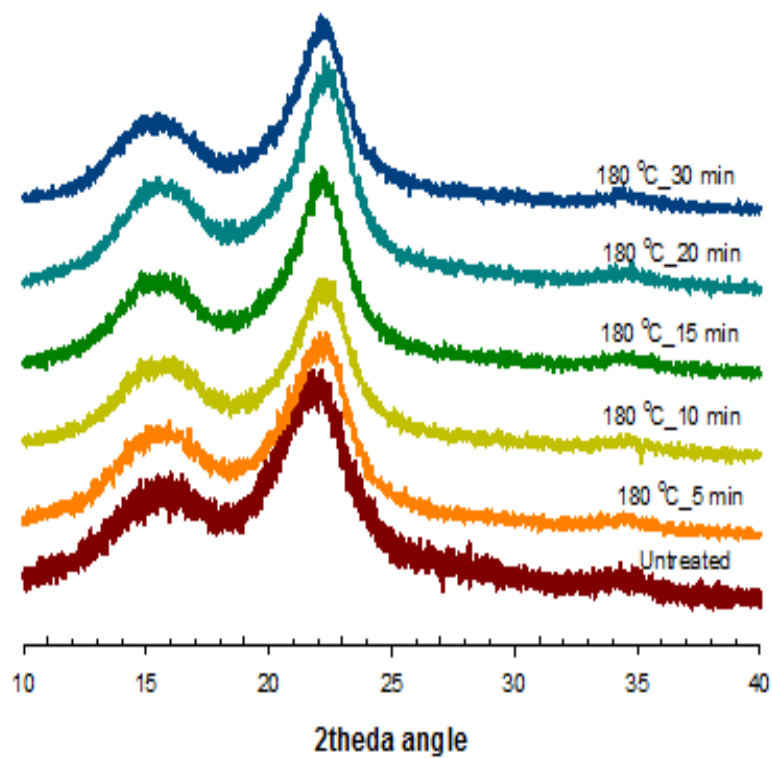


그림 2-9 아임계수 전처리 고상 시료의 XRD 분석 결과



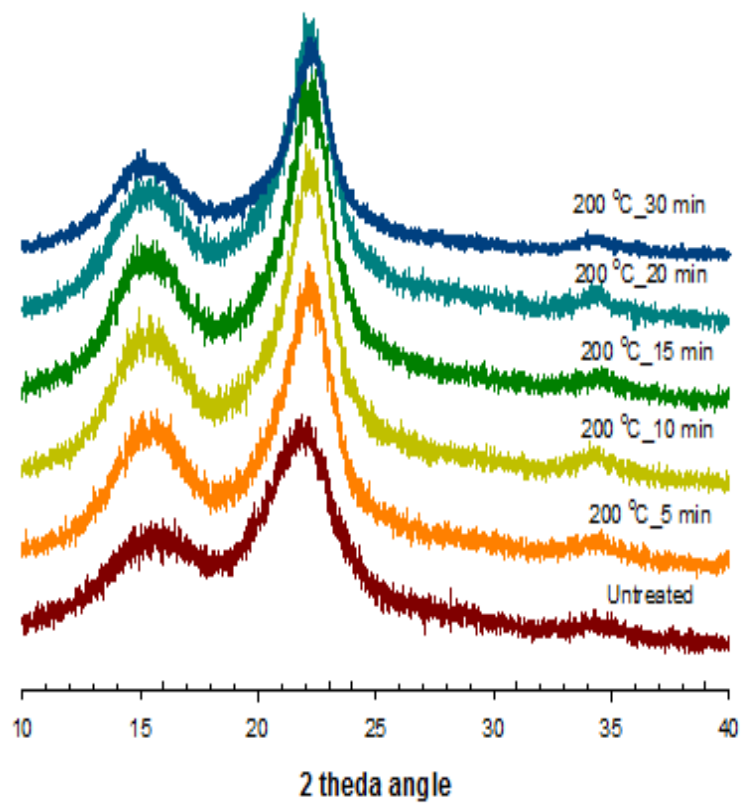


그림 2-9 아임계수 전처리 고상 시료의 XRD 분석 결과 (계속)

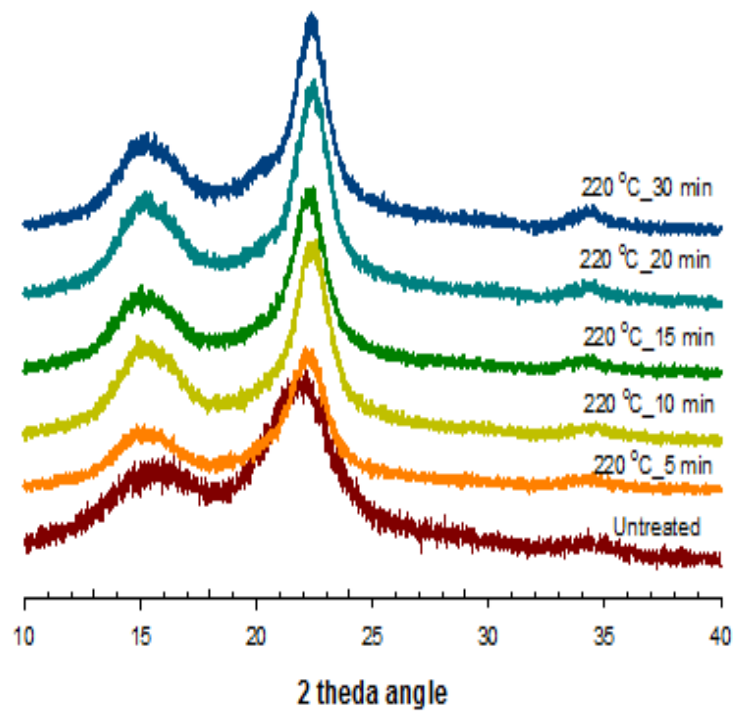


그림 2-9 아임계수 전처리 고상 시료의 XRD 분석 결과 (계속)

분석된 XRD 결과를 토대로 CrI 를 계산하였으며, 그 결과는 전처리 가혹도에 따라 그림 2-10 에 도시하였다. 전처리 전 바이오매스의 CrI 는 57.7%로 계산되었고, 그래프에는 나타내지 않았다. CrI 는 전처리 가혹도에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 최대값은 5.01 의 가혹성 계수를 가지는 조건에서 78.3%로 계산되었다. 이는 전처리 전에 비해 바이오매스의 결정화도가 최대 약 36% 증가한 것을 뜻한다. 한편 가혹도에 따른 전체적인 CrI 의 변화 곡선은 그림 2-6 의 헤미셀룰로오스 제거 수율 곡선과 상당히 유사한 형태를 나타내었다. 이는 전처리 후 바이오매스의 CrI 값 증가가 일차적으로 비결정성을 띠는 헤미셀룰로오스의 제거로부터 기인한 것이기 때문으로 해석된다. 반면 리그닌이나 셀룰로오스의 제거 수율 곡선과는 특별한 연관성을 찾아보기 어려웠다. 리그닌의 경우 제거되는 양이 헤미셀룰로오스에 비해 많지 않아 전체적인 결정화도의 변화에 주는 영향이 상대적으로 적다고 할 수 있고, 셀룰로오스의 경우 결정성 부분은 전처리에 의한 영향이 거의 없다고 볼 수 있다.

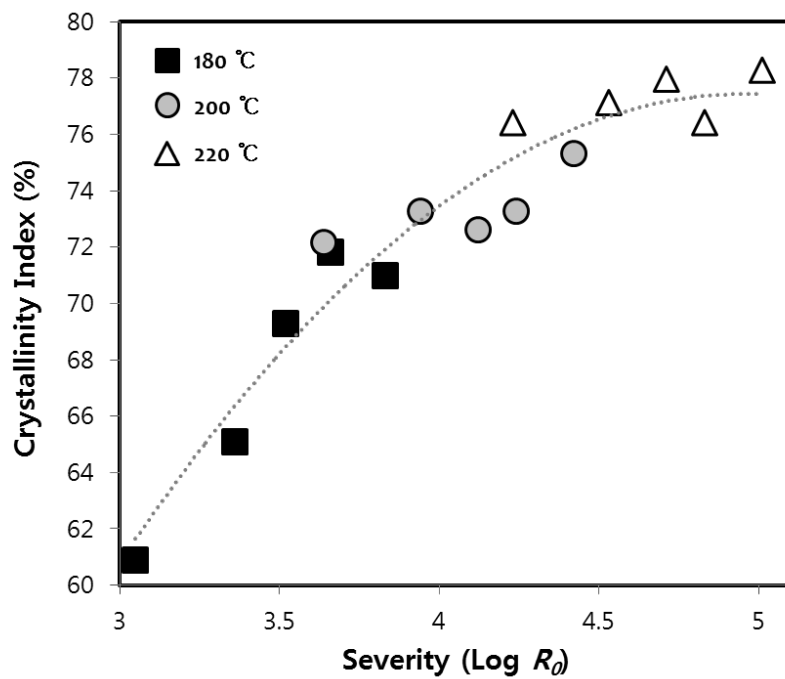


그림 2-10. 전처리 가혹도에 따른 고상 시료의 CrI 변화

전처리로 얻어진 액상 시료에 대해서도 전처리 가혹도에 따른 성분 및 물리화학적 성질의 변화와 상관관계를 알아보기 위한 분석을 진행하였다. 그림 2-11 에 다양한 전처리 가혹도에 따른 액상 가수분해물의 pH 와 수율의 상관관계를 도시하였다. 그래프에서 보듯 액상 시료의 pH 와 수율은 서로 반비례하는 관계임을 확인할 수 있다. 아임계수 전처리가 행해지는 동안 목질계 성분들은 구조적, 화학적 변화를 겪게 되면서 수많은 반응 부산물들을 생성한다. 특히 전처리 조건이 가혹해짐에 따라 아임계수에 용해되어 나오는 성분의 양이 증가할 뿐만 아니라 이미 분해 또는 용해되어 생성된 당이나 리그닌 단량체들이 추가적인 반응을 통해 유기산과 같은 물질로 변환되는데, 이렇게 생성된 부산물들은 그 자체로 또는 중합을 통한 유사리그닌의 생성으로 후속 당화 및 발효 공정에 방해 요소로 작용하게 된다. 알려진 헤미셀룰로오스의 가수분해 반응 기작을 그림 2-12 에 나타내었다. 아임계수 전처리 과정에서 생성되는 대표적인 부산물들은 개미산, 초산, 레불린산과 같은 유기산류, 그리고 HMF 나 푸르푸랄과 같은 유기화합물류를 들 수 있다. 비록 생성된 부산물들이 전체적인 당의 수율을 떨어뜨리고 효소 당화를 방해하기는 하지만 유기산의 경우 그 자체의 쓰임새가 많을 뿐 아니라 전체 반응계의 pH 를 추가적으로 감소시켜 산 촉매 가수분해에 유리한 환경을 제공하기도 하고, HMF 와 같은 물질들은 바이오 고분자 합성용 단량체의 생성을 위한 중간 물질로서 주목받고 있다[84]. 따라서 이러한 부산물들을 효과적으로 분리, 정제하는 공정의 개발이 뒤따른다면 바이오 리파이너리의 상용화를 앞당길 수 있을 것이다.

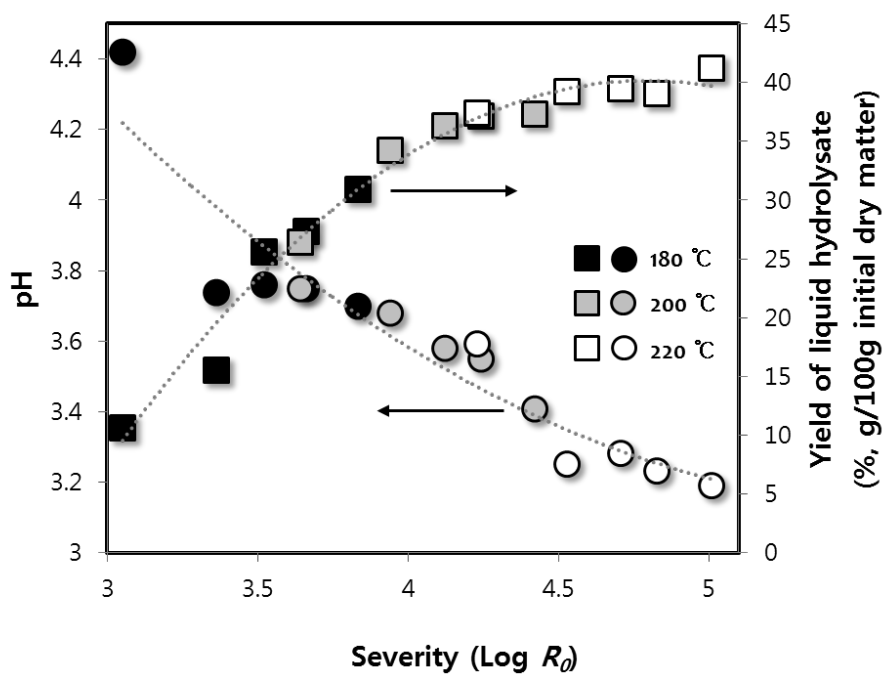


그림 2-11. 전처리 가혹도에 따른 액상 가수분해물의 수율과 pH 변화

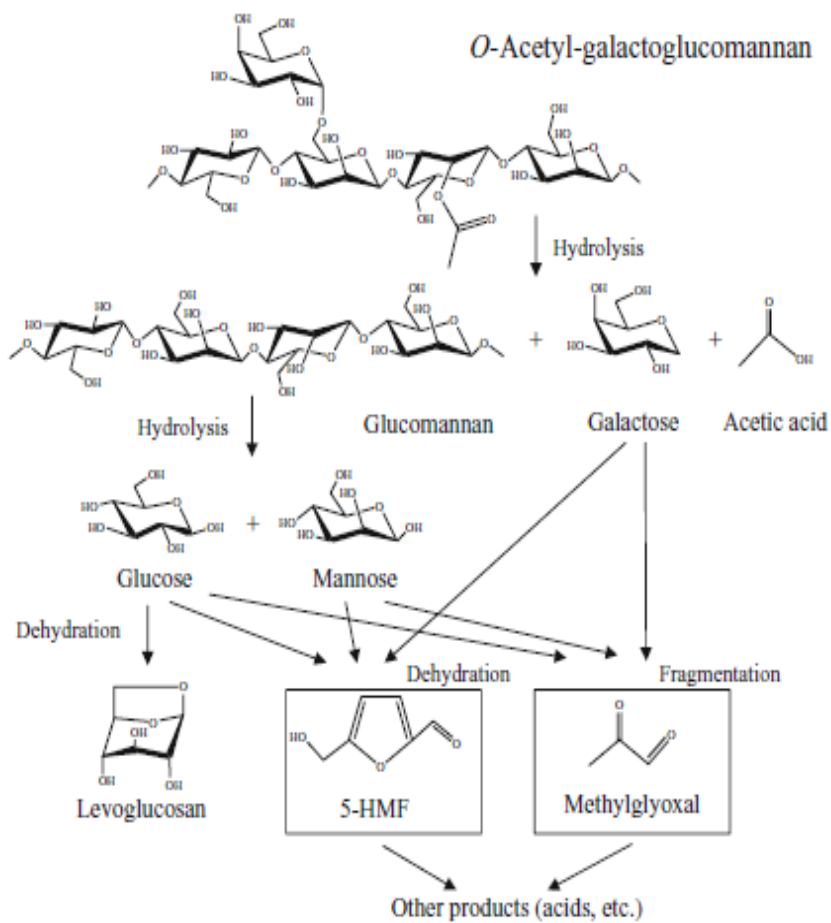


그림 2-12. 아임계수에서 헤미셀룰로오스의 주요 반응 경로[85]

액상 시료 내에 함유된 당당류의 수율을 HPLC 로 측정하였고 그 결과를 그림 2-13 에 나타내었다. 당의 종류별로 약간의 차이는 있으나 전체적으로 온도와 시간에 따라 수율이 증가하다가 다시 감소하는 형태의 곡선을 나타내었다. 이러한 현상은 헤미셀룰로오스의 구성 비율이 가장 높은 자일로오스에서 가장 두드러지게 확인할 수 있었다. 특히 가혹도가 중간 정도인 200 ℃에서는 전처리 시간에 따라 최대값을 보인 다음 점차 다른 물질로 분해되어 수율이 감소하는 경향이 뚜렷하게 나타났다.

당의 수율이 전처리 가혹도에 따라 계속 증가하지 않고 다시 감소하는 경향을 보이는 것은 그림 2-12 에 나타낸 것처럼 아임계수 내에서의 추가적인 반응이 일어남을 의미한다. 반응을 통해 얻어질 수 있는 몇몇 후보 물질들에 대해 HPLC 로 분석을 시도하였으나 특별히 반응 조건에 대해 경향성을 가지거나 주목할만한 양이 생성되는 물질은 관찰되지 않았다.

실험 결과로 미루어 볼 때 고상 및 액상을 통틀어 전처리시 당의 손실을 최소화하는 것을 목표로 하는 경우 추가적인 부반응을 막기 위해서는 낮은 가혹성 계수에서의 전처리가 필요할 것으로 보인다. 그러나 이 경우 헤미셀룰로오스 성분이 완전히 분획되기 어려우므로 공정을 설계함에 있어 목적에 맞도록 헤미셀룰로오스 성분의 분획률과 수율간의 관계를 고려한 최적화를 하는 것이 필요하다.



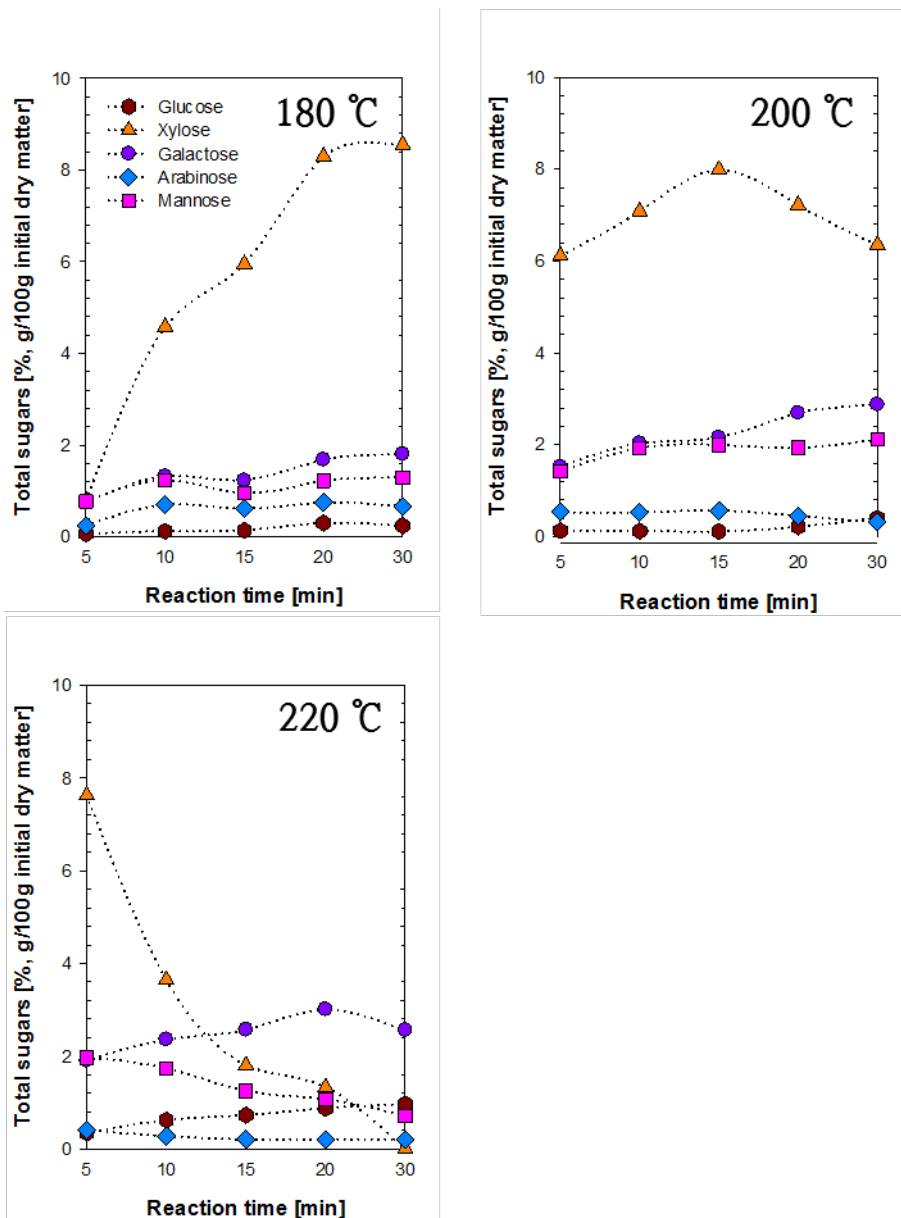


그림 2-12. 전처리 조건에 따른 액상 시료내의 당 함량

#### 2.4.3. 전처리 조건에 따른 효소 당화율 변화

섬유소계 바이오매스의 효소 당화는 다양한 요인에 의해 영향을 받는데, 셀룰로오스의 결정성과 팽윤 정도, 리그닌 함량, 아세틸 결합, 식물 세포벽 내의 셀룰로오스를 둘러싸고 있는 헤미셀룰로오스와 리그닌의 복합 구조 등을 들 수 있다[50].

앞에서도 언급했듯이 전처리 후 바이오매스 표면에 침전된 리그닌 또는 유사리그닌은 낮은 농도의 셀룰라아제 첨가시(5 FPU/g cellulose) 효소와의 비가역적 결합 등을 통해 당화 효율을 떨어뜨리는 원인이 된다[86]. 또한 전처리 후 젖은 바이오매스를 건조시키는 과정에서 발생하는 섬유 각질화(hornification)도 셀룰로오스의 미세 구조를 변형시켜 효소 당화를 저해시키는 요인으로 지적되어 왔다[87]. 본 연구에서는 이 두 가지 효소 당화 저해 요인의 영향을 최소화하고자 시료의 다소 높은 농도의 효소를 이용하였고 고액 분획 과정에서 증류수 세척이 끝난 고상 시료를 건조하지 않고 바로 당화에 이용하였다. 본 실험의 효소 당화 공정에서는 10 FPU/g wet substrate 농도의 셀룰라아제를 이용하였는데 고상 시료의 평균 함수율이 약 60%인 것을 감안하면 약 25 FPU/g cellulose 이상에 해당하는 양이다.

그림 2-13 에 48 h 동안의 효소 당화로 얻은 포도당 수율과 전처리 가혹도 사이의 상관관계를 그래프로 나타내었다. 효소 당화 결과 포도당의 최대 수율은 거의 100%에 가까웠으며 기질 내에 존재하는 글루칸의 대부분이 약 4.83 의 가혹성 계수를 나타내는 조건에서 당화되어 포도당으로 변환된 것으로 확인되었다. 포도당의 수율은 전처리 조건에 따라 다양하게 변화하였는데 180 °C에서 전처리한 경우

포도당의 최대 수율이 30%를 넘지 못했고, 200 °C의 경우 60%를 넘지 못하였으나 220 °C의 경우 전처리 시간이 짧은 경우에도 70% 이상의 수율을 나타내었다. 이는 전처리 온도가 높은 효소 당화율을 얻기 위한 중요한 변수임을 뜻한다. 그러나 같은 온도에서 시간에 따른 포도당 수율의 증가율은 220 °C보다 200 °C에서 좀 더 높은 것으로 나타났다. 전체적으로 보면 효소 당화에 의한 포도당 수율 역시 전처리의 가혹도와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 나타났는데, 이는 앞에서 살펴보았던 여러 가지 전처리 시료의 물리화학적 성질이 전처리 가혹도에 따라 변화하는 것과 매우 연관성이 크다는 좋은 보기가 된다.

전처리 조건에 따른 고상 시료의 포도당 수율은 헤미셀룰로오스의 제거 수율과 비슷한 양상을 보였다. 결과적으로 헤미셀룰로오스의 제거율에 따라 증가하는 바이오매스의 CrI 에 따라서도 비슷한 양상을 보였다. 일반적으로 바이오매스의 CrI 가 높으면 효소 당화에 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 본 연구에서는 CrI 의 증가에 따라 효소 당화율도 증가하는 경향을 보였다. 이것은 결정성 셀룰로오스가 아임계수 가수분해에 의해 영향을 받지 않았다는 것을 의미한다. 즉, 전처리 후 바이오매스의 결정성이 증가하는 것은 셀룰로오스의 결정성이 증가해서가 아니라 비결정성인 리그닌이나 헤미셀룰로오스 등의 물질이 제거되었기 때문이며, 이러한 현상은 몇몇 선행 연구에서도 보고된 바 있다[88, 89]. 이것은 헤미셀룰로오스, 아세틸기, 리그닌 등과 같은 셀룰라아제 활성 저해 물질의 제거가 당화율을 향상시키는데 가장 중요한 요인이라는 것을 뒷받침하는 좋은 증거가 된다.

한편 이 실험으로부터 얻은 결과를 가지고 선행 연구의 결과와

비교한 내용을 표 2-6 에 정리하였다. 전처리 원료나 방법에 따라 다양한 연구 결과들을 비교하였고, 각 문헌으로부터 가장 높은 포도당 수율과 그 때의 실험 조건만을 나타내었다. 아임계수 전처리를 통해 얻은 최대 포도당 수율은 대부분의 경우 90% 이상으로 나타났으며, 이를 통해 아임계수 전처리의 우수성을 확인할 수 있었다. 또한 Wyman 등[94]은 최근 이슈가 되고 있는 몇몇 전처리 방법의 비교를 위해 동일한 시료를 가지고 당화율을 측정하였는데 여기에서도 아임계수 전처리가 다른 방법에 비해 장점을 가지는 것으로 나타났다.

한편 문헌마다 실험 조건에 차이가 있어 직접 비교는 어려우나 본 연구로부터 얻은 최대 포도당 수율은 99% 이상으로 비슷한 조건의 다른 연구들과 비교해 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 아임계수 전처리의 반응 조건이 어느 정도 최적화 되었고 시료의 건조 과정을 생략함으로써 셀룰로오스의 각질화를 막아 효소의 접근성을 높였기 때문에 얻은 결과로 생각된다.

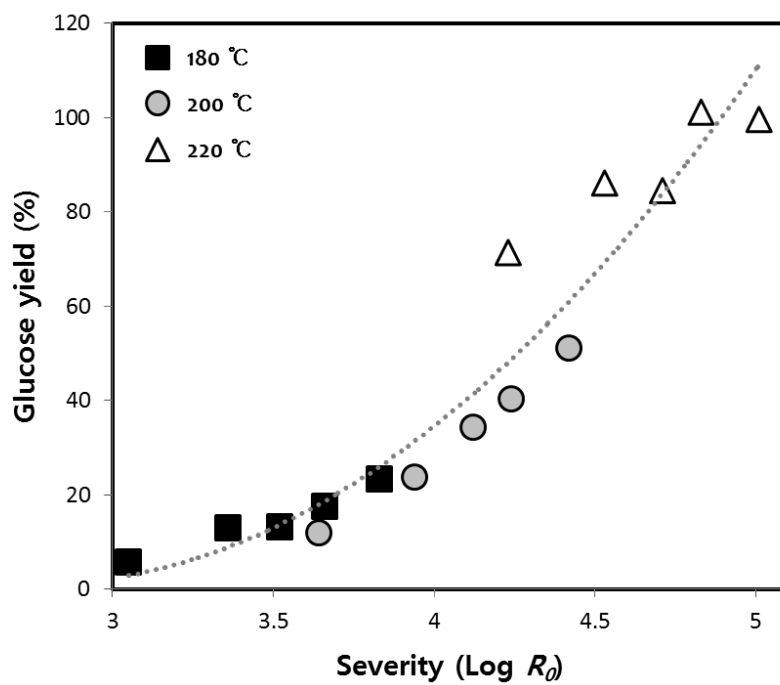


그림 2-13. 48 h 동안의 효소 당화로 얻은 포도당 수율과 전처리  
가혹도 사이의 관계

표 2-6. 아임계수 전처리와 선행 연구의 효소 당화 결과 비교

원료	전처리 방법	전처리 조건	효소 투입량	효소당화 시간(h)	포도당 수율(%)	참고문헌
Tulip tree	SW	220 °C, 20 min, 6.7% w/v	10 FPU/g wet substrate 20 CBU/g wet substrate	48	>99	This work
Sunflower stalks	SW	220 °C, 5 min, 10% w/v	15 FPU/g substrate 23-31 IU/g glucan	72	90.2	[90]
Tulip tree	SW	260 °C, 6.7% w/v	25 FPU/g	48	88.0	[91]
Hybrid poplar	SW	200 °C, 10 min, 15% w/v	40 FPU/g glucan 40 CBU/g glucan	48	63.3	[92]
Oil palm frond	SW	178 °C, 11.1 min, 10.4% w/v	15 FPU/g biomass 15 IU/g biomass	48	92.7	[93]
Rice straw	SW	240 °C, 30 min, 10% w/v	40 FPU/g substrate 5 IU/g substrate	72	~97	[47]
Eucalyptus	SW	210 °C, 3.3 °C/min, 12.5% w/v	10.3FPU/g substrate 10 IU/FPU	48	93.8 (total saccharides)	[48]
Switchgrass	DA	140 °C, 40 min, 11% w/v	15 FPU/g glucan 30 CBU/g glucan	72	76.7	[94]
Switchgrass	SO <sub>2</sub> -steam	180 °C, 10 min, 11% w/v	15 FPU/g glucan 30 CBU/g glucan	72	84.8	[94]
Switchgrass	AFEX	140 °C, 30 min, 33.3% w/v	15 FPU/g glucan 30 CBU/g glucan	72	84.8	[94]
Switchgrass	SW	200 °C, 10 min, 18% w/v	15 FPU/g glucan 30 CBU/g glucan	72	90.6	[94]
Switchgrass	SAA	160 °C, 60 min, 13% w/v	15 FPU/g glucan 30 CBU/g glucan	72	66.0	[94]
Switchgrass	Lime	120 °C, 240 min, 6.7% w/v	15 FPU/g glucan 30 CBU/g glucan	72	79.0	[94]
Tulip tree	Organosolv	140 °C, 50 min, 9% w/v	45 IU/g, 30 CBU/g	72	90.4	[95]

SW = subcritical water, DA = dilute acid, AFEX = ammonia fiber explosion, SAA = soaking in aqueous ammonia

## 2.5. 결론

백합나무를 모델 섬유소계 바이오매스로 선정하였고 헤미셀룰로오스의 분해를 위해 반응 조건을 변화시켜가며 아임계수 전처리 실험을 실시하였다. 전처리 후 얻어진 고상 시료에 대해서는 효소 당화를 실시하여 전처리 조건에 대한 효소의 활성을 평가하였다.

각 공정에 대한 전처리 반응 온도와 체류 시간의 영향을 통합적으로 고찰하기 위해 가혹성 계수를 도입하였고 전처리 조건에 따른 시료의 물리화학적 성질 변화와 효소 당화율 사이의 관계를 도출하였다. 실험 결과 헤미셀룰로오스 성분의 효과적인 분해(90% 이상)를 위해서는 약 4.5 이상의 가혹성 계수 조건에서 전처리가 이루어져야 함을 확인할 수 있었다. 헤미셀룰로오스의 주요 성분은 대부분 가수분해되어 물에 녹아 액상으로 분리되었으며, 고상 시료는 셀룰로오스와 리그닌이 주성분을 이루었다. 효소 당화의 경우 약 4.8 이상의 가혹도에서 전처리한 시료의 경우 거의 100%에 가까운 포도당 수율을 얻을 수 있었으며 비결정성 효소 활성 저해 물질의 제거가 가장 크게 영향을 주는 것으로 판단되었다. 전처리 조건이 가혹할수록 높은 헤미셀룰로오스 분해율과 당화율을 얻는데 유리하지만 동시에 전처리 과정에서 당의 손실도 커지므로 이러한 것들을 종합적으로 고려하여 공정을 설계할 필요가 있다.

이상의 결과에서 백합나무의 전처리 특성은 반응의 가혹도에 따라 밀접한 연관이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 같은 가혹성 계수를 가진다 해도 이를 결정하는 변수가 2 개 이므로 어느 한 조건에 극단적으로 치우치는 경우에는 경향성을 잃을 수 있다. 따라서 가혹성

계수의 적용 범위를 일반화 시키기에는 다소 무리가 있으므로 적절한 적용 범위의 설정이 필요하다. 본 연구의 결과로는 180~220 °C의 온도 조건과 가혹성 계수가 3.0~5.1 이 되는 조건을 만족하는 반응 시간으로 한정할 수 있다. 이를 초월한 범위에서 가혹성 계수에 따라 백합나무의 전처리 특성이 경향성을 가지는지에 대해서는 추가적인 실험을 통한 검증이 필요하나 기존 문헌들의 연구 내용을 바탕으로 추론해보면 약 160~250 °C의 아임계 온도 조건에서는 확장 적용이 가능할 것으로 판단된다.



### 3. 2-1 단계: 개미산 전처리를 통한 리그닌의 분획

#### 3.1. 서론

최근 바이오 연료 또는 바이오 화학제품에 대한 수요가 급증하면서 바이오 원료로서 섬유소계 바이오매스가 큰 주목을 받고 있다. 이전에는 섬유소계 바이오매스를 연료로 사용하기 위해서 대부분 바로 연소시킴으로써 열을 얻는 방법을 이용하였으나 고체라는 특성상 운반 및 저장에 한계가 있었다. 연료 이외에 화학적 변환을 거쳐 이용되는 섬유소계 바이오매스는 대부분 제지 산업을 통해 종이로서 이용되었다. 일반적으로 사용되는 종이의 주성분은 셀룰로오스이므로 섬유소계 바이오매스로부터 리그닌과 헤미셀룰로오스의 제거가 필수적이었고 이에 따른 기술 개발도 주로 제지 산업을 통해 이루어져 왔다. 섬유소계 바이오매스를 화학적으로 변환시키는 목적이 종이에서 에탄올 또는 화학제품으로 변하기는 했지만 오늘날 연구되고 있는 많은 바이오매스 전처리 공정은 그 방법적 측면에서 펄프 공정과 많은 유사점을 가지고 있으며, 실제로 그 기원을 제지 공학에 두고 있는 경우가 많다.

개미산과 같은 유기산 또는 그 과산화물(예: 과산화개미산)을 전처리에 이용하는 것 역시 펄프 공정에 대한 연구로부터 시작되었다. 개미산은 최근 들어 새롭게 주목받고 있는 전처리 용매로서 탈리그닌 효과가 뛰어난 것으로 보고되어 있어 목질 성분의 분획에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대되고 있다[96]. 리그닌을 용해시키기 위해서는  $\delta = 11$  정도의 용해도 계수(solubility parameter)를 가지는

용매가 적절하다고 보고되어 있다[97]. 개미산의 경우  $\delta = 12.1$  정도로 리그닌에 대해 비교적 높은 용해력을 가지고 있으며 유기용매 전처리법에서 사용되는 용매들 중 비교적 안정한 편에 속해 전처리 공정이 끝난 후 높은 회수율과 재활용율을 기대할 수 있다. 또한 개미산에 녹아 있는 리그닌은 물과 같은 역용매를 가하여 침전시킴으로써 손쉽게 회수할 수 있고, 이렇게 얻어진 리그닌은 추가적인 공정을 거쳐 고부가가치의 용도로 사용될 수 있다[98].

그러나 지금까지는 주로 펄프 공정에 대한 활용에 초점을 맞추어 연구가 진행되었기 때문에 셀룰로오스에 대한 효소 접근성에 대한 심도 있는 연구는 제한적으로만 이루어져 왔다[99]. 이는 개미산에 의한 전처리 과정 중 셀룰로오스의 하이드록실기가 개미산과 반응하는 포르밀화 반응(formylation)이 일어나기 때문이다. 포르밀화된 셀룰로오스는 효소에 대한 접근성이 떨어질 뿐만 아니라 발효 공정에서 미생물의 생장에 악영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 결정적인 단점을 보완하기 위한 전처리 공정의 개선이 필요하다.

Kham 등[100] 은 유기산을 이용한 밀짚의 탈리그닌 공정에 대한 연구에서 염기성 과산화수소 용액이 셀룰로오스의 수산기를 재생시킴으로써 펄프의 기계적 물성을 향상시킬 수 있음을 발견하였다. 본 연구에서는 이러한 원리를 이용하여 개미산 전처리된 백합나무 고상 시료에 대해 탈포르밀화를 실시함으로써 효소 당화율의 향상에 미치는 영향을 알아보았다. 전체적으로는 헤미셀룰로오스를 분획한 백합나무 고상 시료로부터 개미산 전처리와 과산화수소 표백을 통해 리그닌을 분획하여 높은 순도의 셀룰로오스를 얻고자 하였고, 이렇게 얻어진 셀룰로오스의 물성과 효소 당화율을 평가하였다.

## 3.2. 재료 및 장치

### 3.2.1. 원료 물질 및 시약

실험에 사용된 백합나무 시료는 2.2.1 절에서 소개한 바와 마찬가지로 다양한 크기를 가진 목분의 형태로 뉴트라팜(주)으로부터 공급받았다. 백합나무 목분은 추가적인 분쇄와 분체 과정을 거쳐 최종적으로 0.25~0.42 mm 의 크기를 가지는 입자로 선별하였고, 1:2 부피 비율의 에탄올-벤젠 용액을 이용한 속실크 추출을 통해 지질이나 클로로필 등 후속 분석 과정의 방해 요소가 될 수 있는 물질들을 추출하였다. 탈지된 시료는 잔류 유기용매의 제거를 위해 45 °C 의 진공 오븐에서 건조하였다. 건조가 끝난 탈지 시료는 실험에 사용되기 전까지 상온의 데시케이터에 보관하였고 평균 함수율은 5% 이내로 유지하였다. 본 연구의 목적은 목질계 바이오매스의 주요 세 성분을 순차적으로 분리하는 전처리 공정의 개발이므로 이 절에서는 아임계수 전처리를 통해 헤미셀룰로오스를 일차적으로 분리해낸 백합나무 고상 시료를 가지고 실험을 진행하였다.

실험에 사용한 개미산(99%), 염산(35-37%), 수산화나트륨(ultra-pure grade), 과산화수소(34.5%) 는 모두 삼전화학으로부터 구입하였다. HPLC 분석에 필요한 표준 물질들은 Sigma-Aldrich 를 통해 구입하여 사용하였다.

### 3.2.2. 실험 장치

아임계수 전처리 는 앞에서의 실험과 마찬가지로 그림 2-3 에 나타낸 것과 같은 316 형 스테인리스 강으로 주문 제작된 23.6 ml 부피의 회분식 반응기를 이용하였다. 열원으로는 그림 2-4 에 나타낸 용융염조를 이용하여 실험을 진행하였다.

개미산 전처리 는 고압을 필요로 하지 않고 산에 의한 부식의 우려가 있으므로 스테인리스 소재의 반응기 대신 내열 및 내부식성을 가진 유리초자를 반응기로 이용하였다. 반응의 열원으로는 대한과학에서 구입한 오토클레이브(WiseClave WACS-1045)를 이용하였다. 내압성이 낮은 유리 초자를 이용하는 경우 고온에서 반응기 내부의 압력 증가로 인해 유리 초자가 깨질 수 있으므로 입구를 느슨하게 잠궈야만 한다. 따라서 반응 도중에 개미산과 같은 유독성 물질이 기화되어 새어나올 수 있는데 오토클레이브를 이용하면 오토클레이브 내부는 밀폐가 되므로 이러한 위험을 상대적으로 줄일 수 있다. 하지만 장치의 특성상 교반이 힘들다는 것은 개선해야 할 점이다. 실험에 사용한 오토클레이브의 모습을 그림 3-1 에 나타내었다.

알칼리 과산화수소 용액을 이용한 탈포르밀화/표백 실험은 대한과학에서 구입한 항온수조(WiseBath WVB-30)를 이용하였다. 펌프를 이용하여 물을 순환시킴으로써 온도를 유지하며 자체적으로는 교반이 불가능하나 내부에 선을 연결하여 자석 교반 장치를 설치할 수 있다. 실험에 사용한 항온수조의 모습을 그림 3-2 에 나타내었다.



그림 3-1. 실험에 사용된 오토클레이브



그림 3-2. 실험에 사용된 항온수조

### 3.3. 실험 및 분석

#### 3.3.1. 아임계수 전처리

개미산 전처리에 사용할 아임계수 전처리 고상 시료의 확보를 위해 220 °C에서 5 min( $\text{Log } R_0 = 4.23$ ) 동안 아임계수 가수분해를 진행하였다. 앞선 실험과 마찬가지로 회분식 반응 시스템을 이용하였고, 전체적인 실험은 2.3.1.절에서 설명한 것과 같은 순서에 따라 진행되었다. 반응이 끝나고 반응기를 냉각시킨 후 반응물들을 앞에서 설명한 것과 같은 방법으로 액상과 고상으로 분리하였다. 개미산 실험을 위해서는 고상 시료만이 이용되었다. 이렇게 얻어진 고상 시료는 정확한 정량 분석을 위해 105 °C의 오븐에서 하룻동안 건조시킨 뒤 무게를 측정하였다.

### 3.3.2. 개미산 전처리 및 탈포르밀화

개미산을 이용한 선행연구에서 유칼립투스 나무를 80% 이상의 농도를 가진 개미산 수용액을 용매로 하여 염산 촉매 하에 개미산의 끓는점 이상의 온도에서 반응시키면 리그닌의 제거에 매우 효과적임이 보고된 바 있다[98]. 본 연구에서는 이 문헌을 참고로 하여 리그닌의 분해를 위한 실험 방법을 설계하고 반응 조건을 설정하였다. 한편 개미산의 농도가 100%에 가까워지면 오히려 후속 발효 공정의 효율을 저해시키는 것으로 보고되었다[30].

반응 용매로는 개미산과 물을 89.5%와 10.3%의 무게 비로 섞은 수용액을 제조하여 사용하였다. 촉매로 사용된 염산은 0.2%의 무게 비만큼 넣어주었다. 바이오매스 시료와 개미산 용액을 1:20(w/v)의 비율로 반응용 유리 초자 반응기에 넣고 뚜껑을 느슨하게 닫아주었다. 약간의 물을 채운 오토클레이브에 반응기를 넣고 오토클레이브를 밀폐한 후, 120 °C에서 2 시간 동안 리그닌 분해를 위한 전처리를 진행하였다. 반응이 끝나면 오토클레이브 내부가 상온에 이를 때까지 방치한 후 개미산 증기를 빨아들일 수 있도록 후드를 연결한 상태에서 오토클레이브의 뚜껑을 열고 반응기를 꺼냈다.

전처리된 시료는 1G3 유리필터(Iwaki, 일본)를 이용하여 진공 하에서 여과시켜 액상과 고상으로 분리하였다. 우선 80 °C로 가열한 90% 농도의 개미산 수용액을 이용하여 고상 시료내에 잔류한 리그닌을 씻어내었다. 검은색을 띠는 리그닌 용액이 더 이상 필터로부터 여과되어 나오는 여과액에서 관찰되지 않으면 이번에는 80 °C로 가열한 증류수를 이용해 잔류 용매와 수용성 성분들을 pH 가 중성이



될 때까지 여과해 주었다. 한편 진공 여과 과정에서 전처리로 인해 바이오매스 입자의 크기와 구조가 변형되어 진공을 걸어주더라도 여과가 잘 되지 않는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 고상 시료 내 잔류 용매 및 부산물의 양을 최소화하기 위해서는 충분한 시간을 두고 천천히 여과를 진행하여야만 한다. 개미산 전처리를 통해 얻은 고상 시료는 105 °C의 오븐에서 건조한 뒤 그 무게를 측정하였다.

알칼리 과산화수소 처리는 개미산 전처리 과정에서 생긴 포르밀기를 제거하고 셀룰로오스의 순도를 높이기 위해 진행하였다. 먼저 증류수에 과산화수소를 0.6% 넣어 묽은 과산화수소 용액을 제조하였다. 여기에 0.4%정도에 해당하는 수산화나트륨을 첨가하며 최종적인 용액의 pH가 12가 되도록 조절하였다. 반응기에 넣어준 개미산 전처리 고상 시료와 알칼리 과산화수소 용액의 비율은 1:10(w/v)으로 하였다. 준비된 반응기는 미리 90 °C로 예열된 항온 수조에 넣고 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 1G4 유리필터를 이용하여 진공 여과를 실시하였다. 이때 미리 준비한 80 °C의 증류수로 고상 시료의 pH가 중성이 되도록 충분히 헹궈주었다. 얻어진 고상 시료는 효소 당화와 분석을 위해 105 °C의 오븐에서 건조하였다. 아임계수 반응을 포함한 전체적인 반응 조건을 표 3-1에 요약하였다.

아임계수 공정과 개미산 공정을 포함한 전체 실험의 순서도를 그림 3-3에 나타내었다.

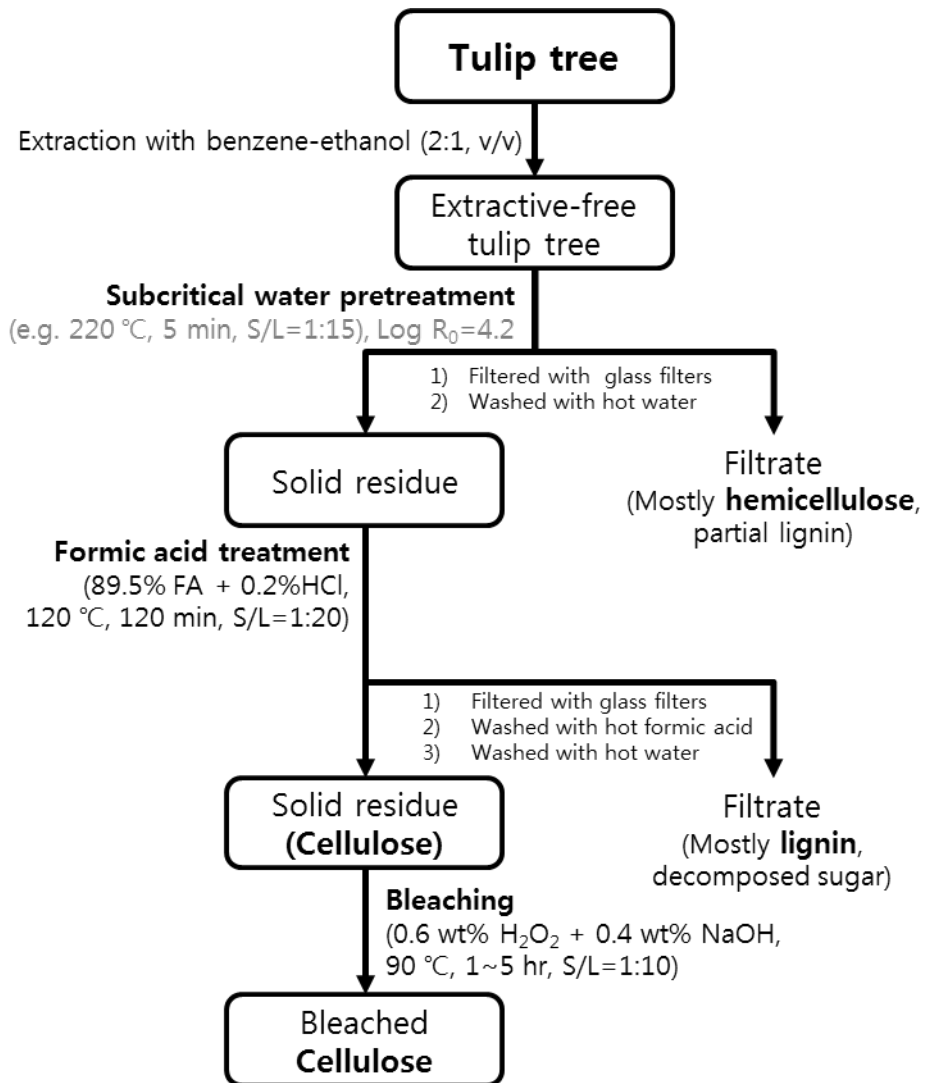


그림 3-3. 아임계수 + 개미산 전처리 공정의 순서도

표 3-1. 개미산 전처리 공정의 순서와 반응 조건

순서	반응 온도 (°C)	체류 시간	시료	반응 용매	시료:용매 비율 (w/v)
1.아임계수 처리 (SW)	220	5 min	백합나무 목분	100% 물	1:15
2.개미산 처리 (FA)	120	2 h	아임계수 전처리 고상 시료	89.5% 개미산 10.3% 물 0.2% 염산(촉매)	1:20
3.과산화수소 처리 (HP)	90	5 h	개미산 전처리 고상 시료	0.4% 수산화나트륨 0.6% 과산화수소수 99.0% 물	1:10

### 3.3.3. 효소 당화

전처리 과정에 따른 효소 당화율의 변화 양상을 관찰하기 위하여 전처리하기 전 고상 시료, 아임계수 전처리된 고상 시료, 개미산 전처리된 고상 시료, 탈포르밀화된 고상 시료를 각각 기질로 삼아 효소 당화를 진행하였다.

당화 실험을 위해 앞에서 언급했던 Celluclast 1.5L 과 Novozyme 188 두 가지 종류의 상용 효소를 이용하였다(그림 2-5). 그러나 본 실험에서는 아임계수 실험 때와는 다른 농도의 효소를 투입하였다. 개미산 전처리를 통한 효소 당화율의 향상을 뚜렷하게 확인하기 위해 Celluclast 1.5L 은 5 FPU/g cellulose, Novozyme 188 은 10 CBU/g cellulose 의 비교적 적은 양을 투입하였다. 전체적인 효소 당화 실험의 순서는 앞에서 설명한 것과 같은 방법을 따랐다. 전체적인 효소 당화 조건은 표 3-2 에 요약하여 나타내었다.

효소 당화는 120 h 에 걸쳐 진행되었고 분석을 위해 정해진 시간마다 당화액으로부터 0.5 ml 의 시료를 채취하여 0.2  $\mu$ m 크기의 주사기 필터를 이용하여 여과시켰다. 여과시킨 용액은 바이알에 담아 HPLC 로 정량 분석을 진행하였다. 당의 분석을 위해 굴절률 검출기와 300 mm x 7.8 mm 크기의 Aminex HPX-87P 컬럼 을 사용하였다. 분석 온도와 시간은 각각 80  $^{\circ}$ C, 30 min 이었고 이동상으로는 물을 0.6 ml/min 의 유량으로 흘려주었다.

표 3-2. 아임계수 + 개미산 전처리 고상 시료의 효소 당화 조건

Sample	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Untreated TL</li> <li>- SCW pretreated solid</li> <li>- Formic acid pretreated solid</li> <li>- Hydrogen peroxide bleached solid</li> </ul>
Biomass loading	2 % (oven dry wt. substrate/vol. of buffer)
Enzyme loading	Celluclast 1.5L: 5 FPU/g substrate Novozyme 188: 10 CBU/g substrate (CBU/FPU = 2:1)
Buffer solution	pH 4.8, 5mM sodium citrate buffer
Incubation temp.	50 °C
Shaking	150 rpm
Reaction Time	120 h
Total volume	10 mL

### 3.3.4. 전처리 생성물의 분석

#### 고상 수율 (Solid yield)

먼저 시료에 포함되어 있는 수분을 제거하기 위하여 일정량의 시료를 미리 무게를 측정한 은박접시 위에 덜어 105 °C의 오븐에서 24 h 동안 건조시켰다. 건조된 시료를 오븐에서 꺼낸 후 바로 무게를 측정하면 공기 중의 수분이 다시 흡수되기 쉬우므로 영향을 최소화하기 위해 데시케이터에서 방냉한 후 무게를 측정하였다. 시료의 건조 전, 후의 무게를 알면 함수율을 구하여 오븐 건조 무게(oven dry weight, ODW) 를 알 수 있다.

고상 수율은 전처리 전의 바이오매스와 전처리 후에 얻어진 고상 시료의 오븐 건조 무게를 이용하여 아래의 식과 같이 계산할 수 있다.

$$\text{고상 수율 (\%)} = \frac{\text{아임계수 전처리된 고상 시료의 건조 무게 (g)}}{\text{아임계수 전처리 전의 백합나무 목분의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

#### 화학 조성 (Chemical composition)

먼저 건조된 시료 0.1 g 에 72% 황산 1ml 을 넣고 유리 막대로 잘 교반해주며 30 °C의 온도의 항온수조에서 2 h 동안 가수분해시킨다. 여기에 28 ml 의 증류수를 첨가하여 황산의 농도가 4%가 되도록 한 후 121 °C의 오토클레이브 에서 1 h 동안 처리한다. 여기서 얻어진 가수분해 용액은 냉각시킨 후 1G4 유리 필터를 이용하여 진공 여과시킨다. 유리 필터에 남은 흑갈색의 고체 찌꺼기는 산 불용성 리그닌으로 105 °C의 오븐에서 24 h 동안 건조시킨 후 무게를 재어 그 양을 측정하였다. 산 불용성 리그닌의 함량은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{산 불용성 리그닌 함량 (\%)} = \frac{\text{필터에 남은 리그닌의 건조 무게 (g)}}{\text{가수분해 전 시료의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

산 가용성 리그닌의 함량은 진공 여과 과정에서 미리 액상 가수분해물 여과액의 부피를 측정한 뒤 UV-Vis 분광기를 이용하여 240 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 구하였다. 이때 여과액의 흡광도가 0.7~1.0 사이가 되도록 증류수로 희석해 가면서 측정한다. 산 가용성 리그닌의 함량은 다음과 같은 식에 의해 구하였다.

산 가용성 리그닌 함량 (%)

$$= \frac{\text{UV 흡광도} \times \text{여과액 부피 (ml)} \times \text{희석 배수}}{\epsilon \times \text{가수분해 전 시료의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

여과액의 일부는 가수분해되어 생성된 단당류와 유기산 등의 정량 분석에 사용되었다. 당과 유기산의 분석에는 HPLC 가 사용되었다. 검출기로는 굴절률 검출기가 사용되었으며 300 mm x 7.8 mm 크기의 Aminex HPX-87P 컬럼과 Aminex HPX-87H 컬럼이 각각 당과 유기산의 분석을 위해 사용되었다. 당 분석을 위해서는 물을 이동상으로 사용하였고 분석 온도와 시간은 각각 80 °C, 30 min 으로 하였다. 유기산 분석의 경우 이동상으로는 5 mM 황산 수용액을 사용하였고 60 °C의 온도에서 0.6 ml/min 의 유량으로 흘려주었다.

#### 접근 가능 기공 부피 (Accessible pore volume)

리그닌이나 헤미셀룰로오스가 분획됨에 따라 구조적으로 효소가

접근 가능한 면적이나 기공 부피는 증가하게 된다. Yu 등은 탈리그닌도와 접근 가능 기공 부피 사이에 밀접한 상관관계가 있는 것을 밝혀냈으며 이것이 효소 당화율을 향상시킬 수 있다고 주장하였다[101]. 또한 Grethlein 은 기공의 크기 분포 변화가 셀룰로오스의 효소 당화율에 주는 영향을 규명한 바 있다[102].

바이오매스의 다공성(porosity)을 분석하기 위한 방법은 여러 가지가 있으나 본 연구에서는 시차주사열량측정기(DSC, Differential Scanning Calorimetry)를 이용한 열적기공측정법(thermoporometry)으로 분석을 시도하였다. DSC 를 이용한 방법은 비교적 최근에 제안된 방법으로 젖은 시료에도 적용할 수 있다는 장점이 있다.

기공 부피 측정을 위한 DSC 기기는 Q100(TA Instrument, 미국) 모델을 이용하였다. 기기에는 냉각기가 장착되어 있고, 퍼지 가스로는 고순도 질소(99.999%, 헤파신가스, 한국)를 50 ml/min 의 유량으로 흘려주었다. 접근 가능 기공 부피는 7~400 nm 범위의 지름을 가지는 기공에 채워진 물의 양을 Gibbs-Thomson 식에 따라 계산함으로써 구할 수 있다[101]. 지름 7 nm 이하의 기공은 일반적으로 알려진 효소의 크기(~6.5 nm) 보다 작으므로 계산에서 제외하였다[103].

약 5 mg 의 충분히 젖은 시료를 알루미늄 팬 위에 놓고 밀폐한 후 기기에 넣고 -70 °C에서 열려준 후 3 min 동안 방치한다. 시료의 감열(sensible heat)을 측정하기 위하여 온도를 -49.5 °C로 올리고 다시 3 min 동안 방치한다. 같은 방법을 정해진 온도(-39.6, -26.4, -19.8, -15.8, -13.2, -9.9, -8.8, -7.2, -5.7, -4.0, -2.6, -2.0, -1.3, -0.9, -0.7, -0.5, -0.3, -0.2, -0.1 °C)에서 실시하였다. 이때 승온 속도는 1 °C/min 으로 하였다. 분석이 끝난 후 시료가 담긴 팬을 열고



105 °C의 오븐에서 24 시간 동안 건조시켜 시료의 함수율을 측정하였다. 전체 기공 부피(total pore volume)는 아래의 식을 이용하여 계산할 수 있다[104].

$$V_p = \frac{\Delta H_{\text{pore}} \times C_{\text{liq}} \times l}{\Delta H_f \times C_{\text{solid}} \times \rho_{\text{liq}}}$$

여기서  $V_p$  는 전체 기공 부피( $\text{cm}^3/\text{g}$ ),  $\Delta H_{\text{pore}}$  는 기공의 융해열( $\text{J/g}$ ),  $\Delta H_f$  는 물의 유효 융해열( $334.5 \text{ J/g}$ ),  $C_{\text{liq}}$  와  $\rho_{\text{liq}}$  은 시료 내 액체의 질량( $\text{g}$ ) 과 밀도( $\text{g/cm}^3$ ),  $C_{\text{solid}}$  는 시료내 고상 성분의 질량을 의미한다.

### X 선 회절 분석 (XRD)

Cu  $K_\alpha$  를 방사선원으로 하고 흑연 단색화 장치를 이용하는 일본 Rigaku 사의 X 선 회절 분석기를 이용하여 고상 시료의 결정성을 측정하였다. 회절 패턴은  $10\sim 40^\circ$ 의  $2\theta$  범위에서 기록되었고,  $1^\circ/\text{min}$ 의 스캔 속도로  $0.02^\circ$ 마다 측정하였다. 가동 전압과 가동 전류는 각각 50 kV 와 200 mA 로 하였다.

X 선 회절 분석의 결과를 이용하여 바이오매스의 결정화도 (crystallinity index, CrI)를 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$\text{CrI (\%)} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100\%$$

### 푸리에 트랜스폼 적외선 분광기 (FT-IR)

감쇠 전반사(ATR, Attenuated Total Reflectance) 방식의 Nicolet

6700 FT-IR 분광기(Thermo Scientific, 미국) 를 이용하여 건조된 고상 시료의 화학적 결합 변화를 측정하였다. 분석은  $4000\sim600\text{ cm}^{-1}$  의 범위에서  $4\text{ cm}^{-1}$  의 해상도로 이루어졌고 스캔 속도는 64 로 설정하였다.

#### **전계방출 주사전자현미경 (SEM)**

전처리 전후의 바이오매스 표면 형태와 구조의 변화를 보기 위하여 전계방출 주사전자현미경을 이용한 관찰을 수행하였다. 건조된 고상 시료를 스테르브에 미리 붙여둔 카본 테이프 위에 잘 펴 바르며 부착시켰다. 카본 테이프 위에 제대로 부착되지 않은 시료는 분석 시 기기를 손상시킬 수 있으므로 바람을 불어 날려주었다. 준비된 시료는 전도성을 부여하기 위해 백금 코팅을 한 후 기기에 넣고 다양한 배율로 표면을 관찰하였다.

### 3.4. 결과 및 고찰

#### 3.4.1. 전처리 시료의 수율 및 조성 변화

각 전처리 과정에 따라 고상 시료의 수율과 화학 조성이 어떻게 변하는지를 살펴보기 위하여 각 시료별로 조성 분석을 실시하였다. 전처리 하기 전의 백합나무 시료는 TL, 아임계수 전처리한 시료는 SW, 개미산 전처리한 시료는 FA, 과산화수소 처리한 시료는 HP 로 각각 표기하였다. 표 3-3 에는 원시료 대비 고상 수율과 각 시료 내의 화학 조성을 정리하였고 표 3-4 에는 각 공정별 고상 수율과 전체 공정을 마친 후 성분별 제거율을 나타내었다.

전체 공정이 끝났을 때 고상 시료의 수율은 처음 넣어준 백합나무 목분의 질량 대비 35.4%였고 그 중 97.6%가 글루칸인 것으로 나타나 매우 높은 순도를 보였다.

공정별로 보면 먼저 220 °C, 5 min 간의 아임계수 전처리로 전체 헤미셀룰로오스의 약 90%가 분획되었다. 이때 글루칸의 함량이 약간 증가하는 것으로 나왔는데 이는 실험 오차인 것으로 생각된다. 리그닌은 전체의 약 40%가 분획된 것으로 나타났는데 이는 그림 2-6 에 나타난 바와 같이 본 실험이 리그닌 제거 수율이 최대치를 나타내는 반응 조건( $\text{Log } R_0 \approx 4.2$ )에서 이루어졌기 때문으로 생각된다. 포르밀기는 약 25%정도 증가한 것으로 나타났는데 반응 중 생성된 개미산이 셀룰로오스의 수산화기와 반응하여 생성되었을 것으로 생각해볼 수 있다.

리그닌의 탈중합을 위한 개미산 처리 결과 리그닌의 제거율이 약

90%까지 높아진 것을 확인할 수 있었으나 글루칸의 손실도 아임계수 전처리에 비해 상당히 증가하는 것을 알 수 있었다. 시료의 색은 리그닌 성분의 제거로 인해 짙은 갈색에서 연한 갈색으로 변화하였다(그림 3-4). 한편 개미산 처리 결과 셀룰로오스의 수산화기가 개미산과 반응하여 다량의 포르밀기가 생성되는 것으로 나타났다.

그러나 HP 에서는 생성된 포르밀기가 대부분 제거되는 것을 확인할 수 있었으며 약간의 탈리그닌 효과도 관찰할 수 있었다. 이렇게 최종적으로 얻어진 셀룰로오스는 과산화수소의 표백 효과로 인해 하얀 색을 띠고 있는 것을 확인하였다(그림 3-4).

표 3-3. 다양한 전처리 시료의 고상 수율과 화학 조성 변화[86]

물질	고상 수율 (%)	화학 조성 (%)								
		Glu	Xyl	Gal	Ara	Man	KL	ASL	FG	AG
TL	100	43.9	18.5	3.7	2.6	4.8	18.5	5.2	0.1	0.8
SW	62.7	71.8	3.3	nd	nd	1.3	18.8	3.5	0.2	0.3
FA	37.6	92.8	1.7	nd	nd	nd	3.3	1.7	3.4	0.6
HP	35.4	97.6	0.7	nd	nd	nd	0.4	1.2	0.1	0.3

nd = 검출되지 않음, Glu = Glucan (글루칸), Xyl = Xylan (자일란), Gal = Galactan (갈락탄), Ara = Arabian (아라비난), Man = Mannan (만난), KL = Klason lignin (산 불용성 리그닌), ASL = Acid soluble lignin (산 가용성 리그닌), FG = Formyl group (포르밀기), AG = Acetyl group (아세틸기)

표 3-4. 다양한 전처리 시료의 이전 공정 대비 고상 수율과 각 성분 별 제거율

물질	이전 공정 대비 고상 수율 (%)	제거율 (%)								
		Glu	Xyl	Gla	Ara	Man	KL	ASL	FG	AG
TL	–									
SW	62.7	–2.5	88.8	100	100	83.2	36.2	57.8	–25.4	76.5
FA	60.0	20.5	96.5	100	100	100	93.3	87.7	–1178	71.8
HP	94.1	21.3	98.7	100	100	100	99.2	91.8	64.6	86.7

Glu = Glucan (글루칸), Xyl = Xylan (자일란), Gla = Galactan (갈락탄), Ara = Arabian (아라비난), Man = Mannan (만난), KL = Klason lignin (산 불용성 리그닌), ASL = Acid soluble lignin (산 가용성 리그닌), FG = Formyl group (포르밀기), AG = Acetyl group (아세틸기)

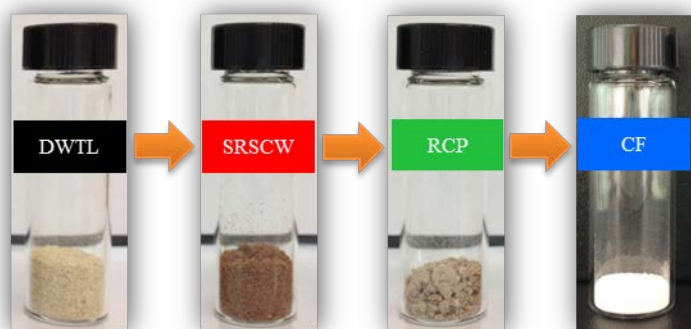


그림 3-4. 백합나무의 전처리 단계에 따른 시료의 색상 변화[86]

### 3.4.2. 전처리 시료의 물리화학적 특성 변화

바이오매스의 유효 표면적, 그 중에서도 기공들이 이루고 있는 내부 표면적은 섬유소계 바이오매스의 효소 당화율을 결정짓는 중요한 변수의 하나로 알려져 왔다[101, 105]. 앞선 연구들에서 헤미셀룰로오스와 리그닌의 분획률이 바이오매스의 표면적 또는 기공 부피의 변화에 대응한다는 것이 밝혀졌으며, 이는 결국 효소의 접근성을 향상시켜 포도당 수율을 높이는데 기여할 수 있음이 보고되었다. 본 연구에서도 Yu 등[101] 이 제안한 열적기공분석법을 이용하여 전처리 전후 기공 부피의 분포 변화를 관찰하였고 이를 그림 3-5 에 나타내었다. 전처리 단계에 따라 기공 부피가 증가하는 것이 관찰되었으나 부피 증가의 대부분은 효소의 크기보다 작은 지름을 가지는 기공의 증가로 인한 것으로 보인다. 비록 기공 부피의 증가가 매우 작은 지름을 가지는 기공들에 집중되기는 했으나 큰 지름을 가지는 기공들도 전처리 단계에 따라 부피가 증가하는 양상을 보였다.

지름 7 nm 이하의 기공은 제외하고 단위 무게당 효소 접근 가능 기공 부피를 계산하여 전처리 단계별로 도시한 결과 그림 3-6 처럼 전처리 단계에 따라 선형적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 전처리 전의 단위 무게당 기공 부피는  $0.24 \text{ cm}^3/\text{g}$  이었으나 아임계수 전처리 후에는  $0.49 \text{ cm}^3/\text{g}$  으로 증가하였는데, 이는 주로 헤미셀룰로오스의 제거로 인한 것으로 보인다. 개미산과 과산화수소 처리를 통해 리그닌과 포르밀기가 제거된 바이오매스의 단위 무게당 기공 부피는 각각  $0.64 \text{ cm}^3/\text{g}$ ,  $0.92 \text{ cm}^3/\text{g}$  로 증가하였다. 이를 통하여 각 성분의 분획이 기공 부피의 증가에 효과적임을 확인하였다.



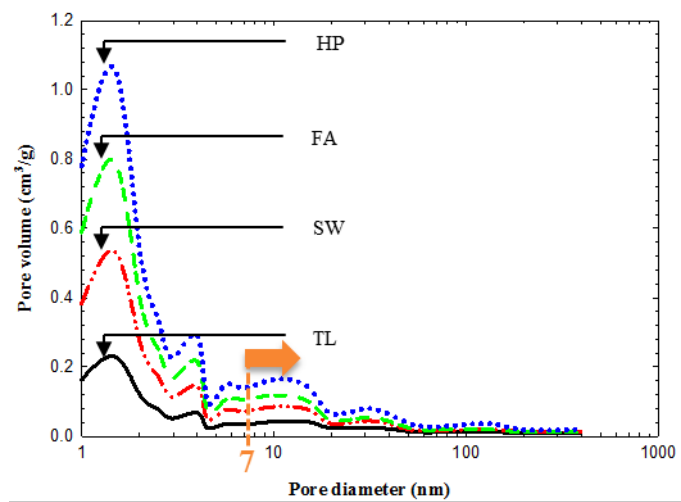


그림 3-5. 다양한 전처리 단계에 따른 바이오매스 표면의 기공 크기 분포 변화[86]

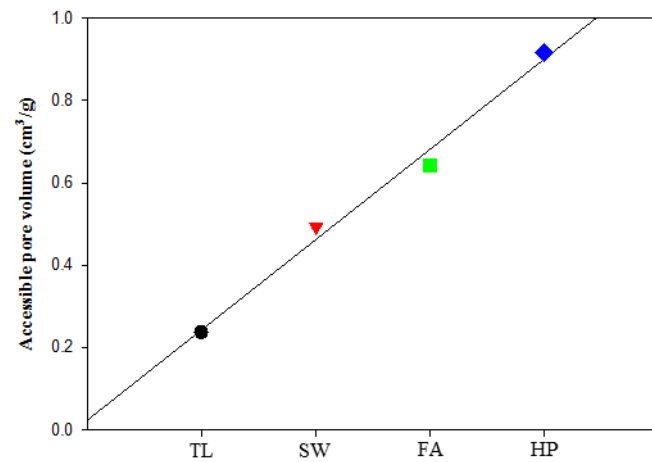


그림 3-6. 접근 가능 기공 부피와 전처리 단계별 상관관계[86]

앞선 아임계수 전처리 실험에서도 보였듯, 바이오매스의 결정성 또한 효소 당화율에 영향을 미치는 중요한 인자 중 하나이다. 본 실험에서 행해진 다양한 전처리 단계별 CrI 변화를 보기 위하여 XRD 를 이용한 분석이 진행되었고 그 결과를 그림 3-7 에 나타내었다.

2 절에서와 마찬가지로 SW 의  $I_{002}$  피크( $2\theta = 22^\circ$  부근) 는 피크의 강도가 증가하고 폭이 좁아진 것을 확인할 수 있었다. 이때의 CrI 값은 그림 3-8 에 나타내었듯이 54.6%에서 70.6%로 크게 증가하였다.  $\pi$ 의 경우  $I_{002}$  피크의 강도가 더욱 증가하고 모양도 더욱 뾰족하게 변하였다. CrI 값도 79.7%로 더욱 증가하는 모습을 보였다. 아임계수와 개미산 처리 후 시료의 결정화도 증가는 비결정성인 헤미셀룰로오스와 리그닌의 함량이 줄어들어 상대적으로 바이오매스 내의 결정성 셀룰로오스의 비율이 증가하였기 때문인 것으로 풀이된다. 특히 FA 의 경우 셀룰로오스 섬유소들이 서로 응집하여 밀집된 구조를 형성함으로써 결정화도를 높이는데 기여한 것으로 보인다. 이는 그림 3-3 에서도 확인할 수 있는데 FA 는 섬유 형태의 작은 입자들이 서로 뭉쳐있는 형태로 회수되었다. 유기용매를 이용한 전처리 과정에서 수산화기의 에스테르화 반응 등을 통해 섬유소 내부의 수소 결합이 감소하는 것이 관찰되었는데, 이러한 이유로 각 섬유들간의 결합이 점점 뿔뿔해지면서 응집하거나 엉키는 성질을 가지게 된다[100]. 또한 아임계수와 개미산 전처리 후 비결정성 영역( $2\theta = 13.0\sim 18.0^\circ$ )의 피크 크기가 증가하는 것이 관찰되었는데 이는 평행 사슬 구조를 이루고 있던 셀룰로오스 I 결정 구조(cellulose I crystalline structure)가 전처리 과정에서 셀룰로오스 II 결정 구조(cellulose II crystalline structure)로 변형되었음을 나타낸다.

그러나 HP 의 XRD 피크 크기는 결정성 영역( $2\theta = 22^\circ$ ) 과 비결정성 영역( $2\theta = 13.0\sim 18.0^\circ$ ) 모두에서 아임계수나 개미산으로 처리한 시료의 그것에 비해 현저히 줄어들었다. 계산된 CrI 값은 76.9%로 나타났다. 이는 과산화수소에 의해 수산화기가 다시 재생됨에 따라 셀룰로오스 섬유들 간의 엉킴과 응집 정도가 다시 줄어들었기 때문으로 해석된다. 이러한 수산화기의 재생 과정에서 셀룰로오스 섬유소 간에 존재하는 사슬 내부 수소 결합이 증가하여 팽윤이 일어나기 쉽게 변함으로써 효소가 접근하기가 좀더 쉬운 구조가 된다[100, 106].

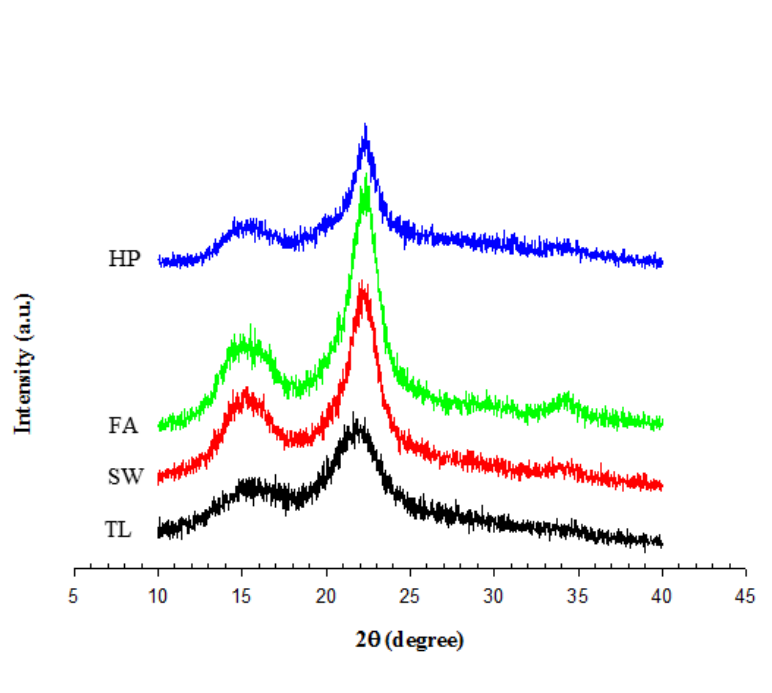


그림 3-7. 전처리 단계별 XRD 패턴 비교[86]

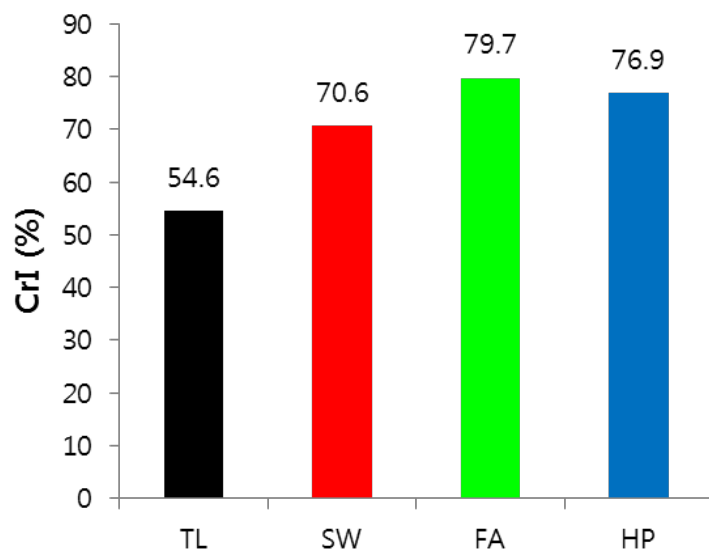


그림 3-8. 전처리 단계별 CrI 변화

전처리 단계에 따른 고상 시료 표면의 화학 결합 변화를 구체적으로 알아보기 위하여 FT-IR 분석을 진행하였고 파수에 따른 흡수 파장을 그림 3-9 에 나타내었다. 각 피크가 나타나는 위치에 따른 화학결합의 종류와 해석은 표 3-5 에 정리하였다.

TL 의  $1732\text{ cm}^{-1}$ (3)에서 나타나는 피크는 에스터의 비공액(unconjugated) C=O 결합을 나타내며 헤미셀룰로오스의 존재 하에 나타나는 피크인데[107], 아임계수 전처리 후에는 헤미셀룰로오스의 제거로 인해 거의 관찰되지 않았다. 반면,  $1593$ (6),  $1503$ (7),  $1423$ (8)  $1267\text{ cm}^{-1}$ (10)에서 나타나는 리그닌의 특징적인 피크의 세기는 증가하는 경향을 보였다. 그러나  $1234.51\text{ cm}^{-1}$ (11)에서 나타나는 과시아실기의 흡수 피크는 상대적으로 감소하는 경향을 보였는데, 이는 아임계수 처리 과정에서 제거되는 리그닌의 주성분이 과시아실기를 포함하고 있기 때문일 것으로 추정된다. 위에 언급한 헤미셀룰로오스와 리그닌 피크는 개미산 및 과산화수소 처리 시료에서는 거의 검출되지 않았다.

한편 FA 의  $1717.43\text{ cm}^{-1}$ (4) 부근에서 매우 뚜렷한 피크가 나타났는데 이는 개미산이 셀룰로오스 사슬 내부로 침투하여 새로운 결합을 형성함으로써 생기는 것으로 알려져 있다[108]. 이는 개미산 처리의 결과로 셀룰로오스의 수산화기가 포르밀기로 치환되었음을 나타내는 증거인데, 과산화수소 처리 후 수산화기의 재생으로 인해 피크가 검출되지 않은 것으로도 확인이 가능하다.

$3340\text{ cm}^{-1}$ (1)에서 나타나는 O-H 수소결합 스트레칭 피크와  $2900\text{ cm}^{-1}$ (2)에서 나타나는 C-H 스트레칭 피크는 비결정성 셀룰로오스의 존재를 나타낸다. 반면  $1369$ (9),  $1316$ (10),  $1156$ (14),  $1054$ (15),

1033(16), and 898  $\text{cm}^{-1}$ (17)에서 나타나는 C-O 스트레칭 및 C-H 변형 피크는 결정성 셀룰로오스의 존재를 나타낸다[109]. 비결정성 영역에서 수산화기끼리 이루는 분자간 수소 결합은 3340  $\text{cm}^{-1}$ (1) 에서 뚜렷한 피크를 나타내는데, 이 피크는 셀룰로오스의 결정성이 강해질수록 낮은 파수 쪽으로 이동하는 경향을 보인다[110]. 그런데 HP 에서는 이들 결정성 또는 비결정성 영역의 피크 세기가 FA 에 비해 감소하는 것이 관찰되었다. 이는 과산화수소에 의해 처리되는 동안 에스터기의 가수분해나 셀룰로오스 섬유의 수화 등으로 인해 셀룰로오스의 수소결합 네트워크가 일부 붕괴되었음을 의미한다. 이러한 변화로 인해 1641  $\text{cm}^{-1}$ (5)에서는 흡수된 물의 구부림 피크, 1202  $\text{cm}^{-1}$ (13)에서는 방향족 고리 평면에서의 C-O-H 구부림 피크도 관찰되었다[106].



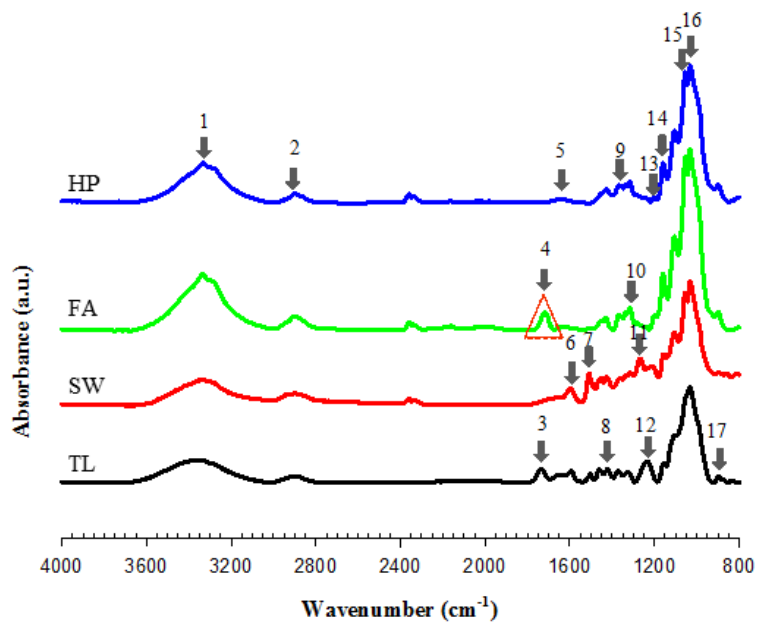


그림 3-9. 전처리 단계별 FT-IR 분석 결과[86]

표 3-5. 파수에 따른 IR 흡수 피크의 해석과 세기 비교[86]

Band position	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Attribution and description of FT-IR absorption	Intensity of the band			
			TL	SW	FA	HP
1	~3354/3340	O-H stretching vibration (inter/intra molecular in cellulose)	0.0127	0.0261	0.0540	0.0381
2	~2900	C-H stretching (CH <sub>3</sub> - /CH <sub>2</sub> - groups in cellulose)	0.0054	0.0121	0.0132	0.0081
3	1736.12	C=O of ester (hemicellulose)	0.0125	0.0039	-	-
4	1717.43	C=O in acids or ester	0	0	0.0170	-
5	1641	bending mode of absorbed water	0	0	0	0.0030
6	~1593	aromatic skeletal vibrations plus C=O stretch	0.0114	0.0164	-	-
7	~1503	aromatic skeletal vibrations in lignin	0.0080	0.0316	-	-
8	~1423	aromatic skeletal vibrations in lignin combined with CH deformation	0.0126	0.0281	0.0112	0.0129
9	~1369	O-H in plan bending in cellulose	0.0111	0.0265	0.0138	0.0167
10	~1316	phenolic OH	0	0	0.0215	0.0197
11	1267.21	C-O vibration in syringyl ring	0	0.0463	-	-
12	1234.51	guaiacyl ring plus C=O stretching vibration in lignin	0.0205	0	-	-
13	1202	C-O-H in plane bending at C <sub>6</sub>	0	0	0	0.0053
14	~1156	C-O-C vibration in cellulose and hemicellulose	0.0183	0.0506	0.0547	0.0378
15	~1054	C-O stretch in cellulose /aromatic CH in plane deformation	0	0.1112	0.1689	0.1272
16	~ 1033	C-O stretch in cellulose and hemicellulose	0.0930	0.1219	0.1763	0.1335
17	~ 899	C-H deformation in cellulose	0.0056	0.0330	0.0171	0.0169

각 전처리 단계에 따른 고상 시료의 표면 변화를 그림 3-10 에 나타내었다. 표면 관찰은 각각 500 배, 3,000 배, 10,000 배의 배율로 SEM 사진을 찍어 진행하였다.

TL 은 표면의 기공이 대부분 닫혀있는 형태로 관찰되었다. SW 에서는 일부분 또는 전체가 열린 기공들이 다수 관찰되었고 구형의 리그닌 또는 유사리그닌이 표면에 침전되어 있는 것이 관찰되었다. 여기에 대해서는 2.4.2 절에서 상세히 설명하였다.

FA 의 확대 사진에서는 이전과는 다른 모습이 관찰되었다. TL 이나 SW 에 비해 길이가 짧고 표면에 섬유모양의 형상이 일부 드러나는 형태의 입자가 다수 관찰되었다. 이는 헤미셀룰로오스에 이어 리그닌이 빠져나가면서 뼈대가 되는 셀룰로오스가 입자의 대부분을 구성하게 되기 때문인 것으로 보인다. 그러나 완전한 섬유 모양의 입자는 거의 관찰되지 않았다.

HP 입자는 FA 입자에 비해 더 작아지고 섬유의 형태에 가까운 모양을 하고 있었다. TL 과 비교해 보면 구조가 완전히 변형된 것을 확인할 수 있었다. 종합해보면, 전처리 단계에 따른 고상 시료 입자의 크기 와 형태, 표면 구조 변화는 식물체의 주요 구성 성분인 헤미셀룰로오스와 리그닌의 분해가 주 원인인 것으로 보인다. 여기에 전처리 용매와의 반응 등으로 인한 셀룰로오스 수소결합의 변화도 구조 변화에 영향을 주는 것으로 판단된다.

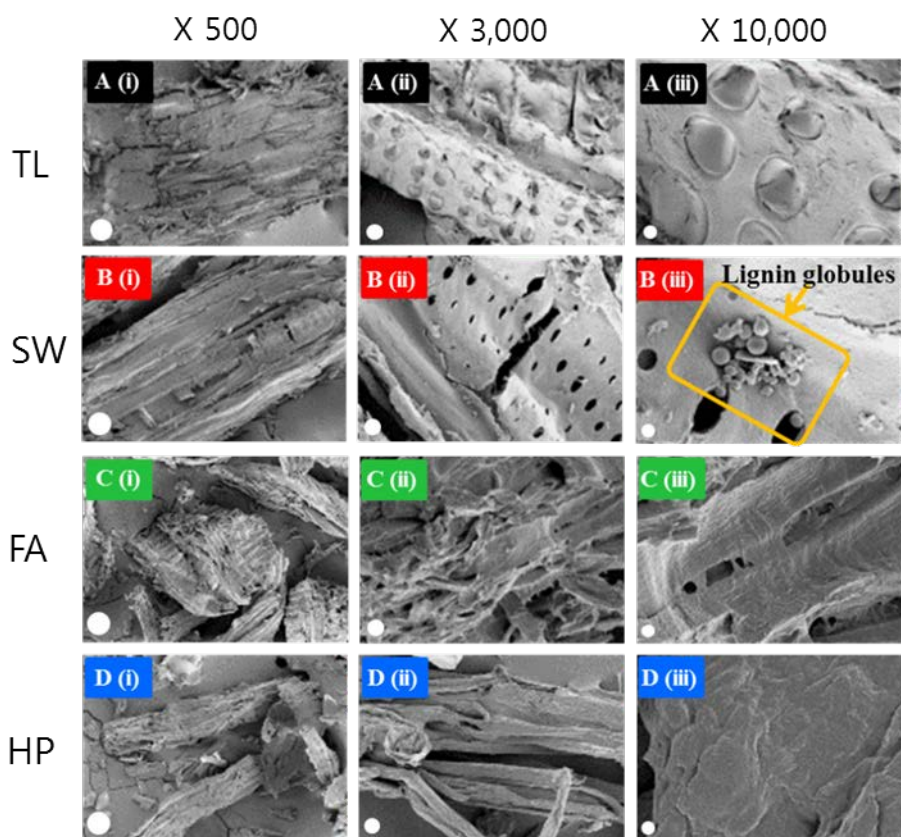


그림 3-10. 전처리 단계별 고상 시료 표면의 미세구조 변화[86]

### 3.4.3. 전처리 단계에 따른 효소 당화율 변화

각 전처리 단계에 따른 효소 당화율을 평가하기 위해 120 h 동안 효소 당화를 실시한 뒤 매 24 h 마다 포도당 수율의 변화를 측정하여 비교하였다. 전처리 단계별 효소 당화율의 차이를 극대화하여 살펴보기 위해 비교적 낮은 농도의 효소를 사용하였다(Celluclast 1.5L: 5 FPU/g cellulose, Novozyme 188: 10 CBU/g cellulose). 그 결과를 그림 3-11에 그래프로 나타내었다.

실험 결과 HP가 효소 가수분해 속도가 다른 단계의 시료에 비해 월등히 빠른 것으로 나타났다. HP는 당화 24 h 만에 약 29%의 포도당 수율을 보였으며, 120 h에서 64%의 최대 수율을 기록하였다. 반면 SW는 포도당 수율의 증가 속도가 과산화수소 처리 시료에 비해 매우 느렸으며 최대 수율은 120 h에서 약 19%로 HP에 비해 약 30% 정도 수준에 머물렀다. 이는 2.4.3절에서 언급했던 것처럼 전처리 후 바이오매스 표면에 침전되어 존재하는 리그닌 또는 유사리그닌이 효소가 접근 가능한 면적을 줄이고 나아가 효소와 비가역적으로 결합함으로써 효소의 활성을 떨어뜨리기 때문인 것으로 보인다[81, 82]. 리그닌의 함량은 셀룰로오스의 접근성과 팽윤 정도에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 효소의 농도가 낮은 경우 상대적으로 손실되는 효소의 비율이 높아져 효소의 추가 투입이 필요하므로 경제성 확보에 어려움을 겪게 된다.

그러나 FA에서는 효소 당화를 방해하는 성분인 헤미셀룰로오스와 리그닌의 대부분이 제거되었음에도 불구하고 매우 낮은 포도당 수율을 나타내었다. FA는 심지어 TL보다도 낮은 당화율을 보였다. 표 3-4의

결과로 보아 개미산 처리 과정에서 생성된 포르밀기가 효소 당화를 방해하는 성분으로 작용한 것은 명백하다. 포르밀기의 효소 당화 방해 작용 기작은 아직 확실히 밝혀진바 없으나 포르밀기 자체의 독성으로 인한 효소 작용 방해와 분자간의 응집을 일으켜 셀룰로오스의 팽윤을 방해하고 효소의 접근을 차단하기 때문이라는 설이 유력하다[86].

Zhu 등이 밝힌 것처럼 바이오매스의 표면적과 기질 내 함유된 리그닌의 비율은 효소 당화율에 영향을 주는 중요 인자들이다[111]. 그림 3-12 과 3-13 에 각 전처리 단계에 따라 접근 가능 기공 부피와 리그닌의 제거 수율이 포도당의 수율과 어떤 관계가 있는지를 도시하였다. 화살표는 전처리의 순서를 나타낸다. 전처리가 진행됨에 따라 기공 부피는 증가할수록, 리그닌의 함량은 감소할수록 포도당의 수율이 높아지는 경향을 보였으나 FA 의 경우만 포르밀기의 영향으로 매우 낮은 포도당 수율을 보였다. 이는 개미산 전처리 공정 후 효소 당화에 있어 포르밀기의 영향이 그 어떤 인자들보다도 가장 중대함을 나타내고 있다. 따라서 개미산 전처리 공정을 통해 높은 포도당 수율을 얻기 위해서는 포르밀화된 셀룰로오스를 재생시킬 수 있는 과산화수소 처리와 같은 후속 공정이 필수적이라 할 수 있다. 과산화수소 처리 후 효소 당화율이 급격하게 상승한 것은 효소 독성을 가진 포르밀기의 제거와 그로 인해 셀룰로오스의 분자 구조가 변하면서 팽윤도 및 표면적이 증가한 데서 원인을 찾을 수 있다.

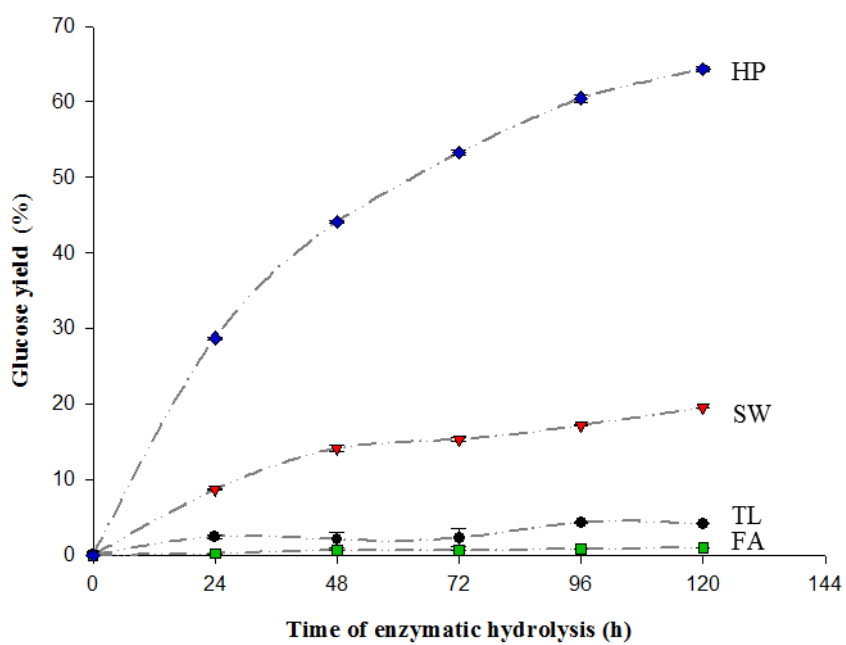


그림 3-11. 효소 당화 시간에 따른 각 전처리 단계별 포도당 수율  
비교[86]

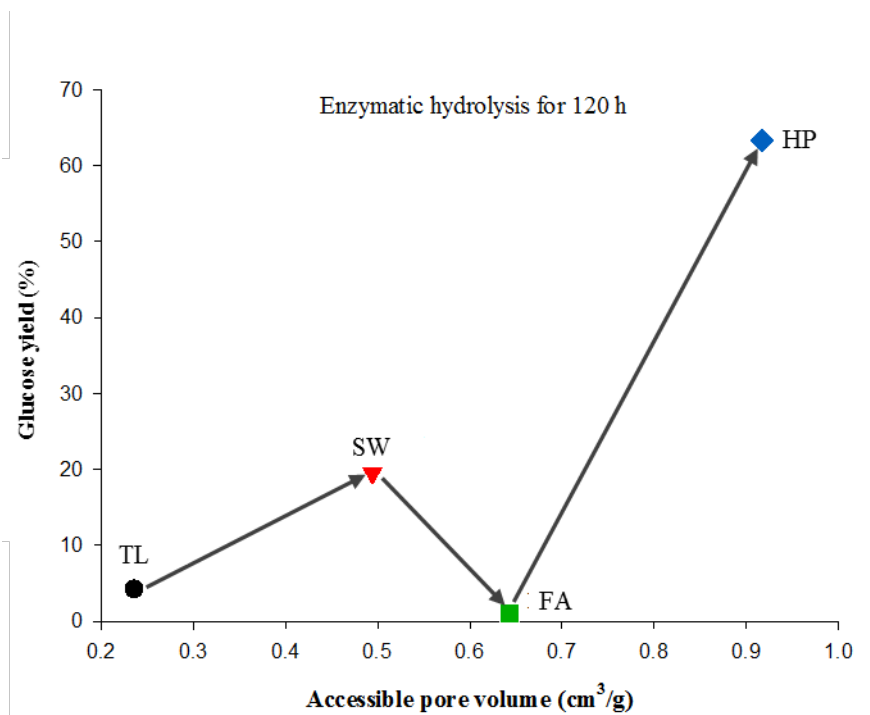


그림 3-12. 전처리 단계에 따른 접근 가능 기공 부피와 포도당 수율(120 h, 5 FPU/g cellulose)과의 관계 비교



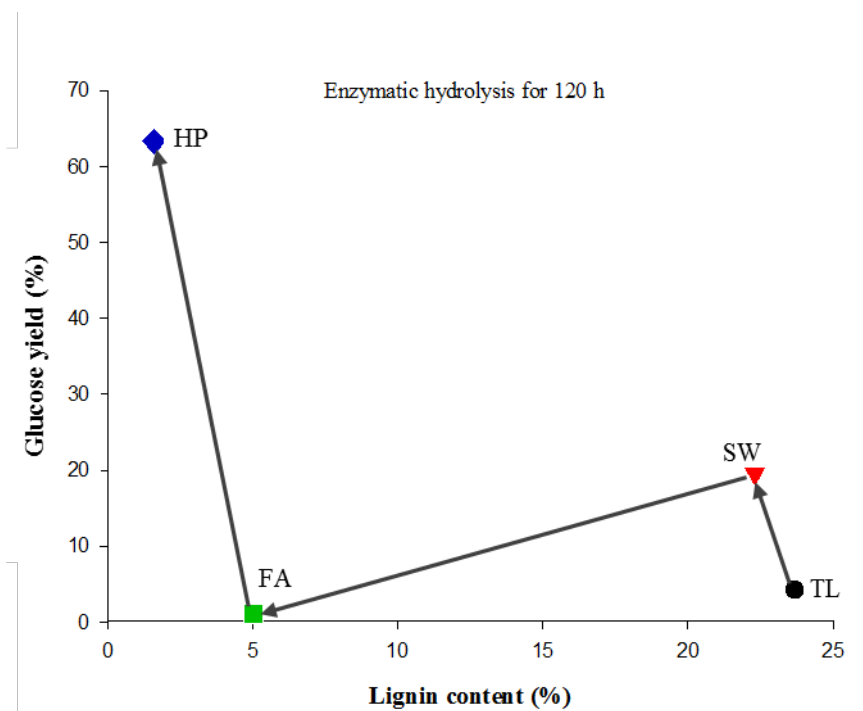


그림 3-13. 전처리 단계에 따른 리그닌 함량과 포도당 수율(120 h, 5 FPU/g cellulose)과의 관계 비교

### 3.5. 결론

아임계수 전처리에 의한 헤미셀룰로오스 분획에 이어 리그닌을 분획하여 순도 높은 셀룰로오스를 수득하기 위해 개미산 전처리를 실시하였다. 개미산 전처리는 크게 리그닌 분획을 위한 개미산 처리와 포르밀기 제거 및 표백을 위한 과산화수소 처리로 구성되었다. 각 단계별로 얻어진 고상 시료를 이용해 고상 수율, 화학 조성, 색상 및 표면 구조, 결정화도 등의 물리화학적 성질을 분석하고 비교하였다. 또한 효소 당화를 실시하여 헤미셀룰로오스와 리그닌의 분획이 효소 당화율에 어떤 영향을 주는지도 알아보았다.

아임계수 전처리에 이은 개미산 전처리는 각각 헤미셀룰로오스와 리그닌을 높은 선택성으로 분획함으로써 순도 높은 셀룰로오스를 얻을 수 있는 장점을 가진 것으로 평가된다. 그러나 개미산 만으로 얻어진 셀룰로오스는 포르밀기의 독성 및 셀룰로오스의 분자 구조 변화로 인해 당의 수율이 현저히 낮아지는 결정적인 단점을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 이를 보완하기 위해 과산화수소를 이용한 탈포르밀화 및 표백을 실시하였다. 이렇게 얻어진 순백색의 셀룰로오스는 아임계수 전처리 시료에 비해 매우 높은 포도당 수율을 나타내었다. 낮은 셀룰라아제 농도(5 FPU/g cellulose)에도 불구하고 120 h 에서 약 65%의 최대 포도당 수율을 얻을 수 있었다. 아임계수 및 개미산의 순차적 전처리 공정은 섬유소계 바이오매스의 주성분을 효과적으로 분획할 수 있으나 최적 조건 확립을 위한 노력이 필요하고 표백과 당화율 향상을 위한 추가 공정이 필요한 점 등은 개선해야 할 점으로 생각된다.

## 4. 2-2 단계: 과산화수소 전처리를 통한 리그닌의 분획

### 4.1. 서론

앞에서도 언급하였듯이 현존하는 수많은 섬유소계 바이오매스 전처리 방법이 목재 및 제지 공학으로부터 기원하여 발전해 왔다. 특히 전통적인 펄프 공정에서는 독성을 가지거나 환경에 유해한 화합물의 사용이 많았기 때문에 펄핑 효율은 높이면서 환경적인 부담을 덜고자 하는 노력이 많이 진행되어 왔다. 그 예로 과산화개미산(performic acid), 과산화초산(peracetic acid) 등과 같은 과산 종류와 과산화수소를 포함하는 과산화물은 화학 펄프의 표백 및 리그닌 제거에 있어 기존의 염소계 화합물을 대체할 수단으로 주목받아 왔다[112]. 그 중 과산화수소는 수소원자 두 개와 산소원자 두 개가 결합한 가장 간단한 형태의 과산화물로서 강한 산화력을 가지고 있어 다양한 종류의 산화 반응에 응용되어 왔다. 특히 반응으로부터 오직 물 만이 부산물로서 생성되므로 환경적인 측면에서도 유리한 점을 가지고 있다[113].

최근에는 바이오매스 기반 연료와 화학제품에 대한 관심이 증가하면서 효소 당화율의 향상을 위해 과산화물을 섬유소계 바이오매스의 전처리에 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 1984 년 Gould[114]가 처음으로 알칼리 조건에서 과산화수소를 이용하여 밀짚과 옥수수대와 같은 농업 부산물로부터 탈리그닌을 시도한 이래 수많은 연구자들이 이와 관련된 연구를 진행하였다. 이러한 연구들은 주로 초본계 바이오매스를 중심으로 이루어져 왔고 [25, 115, 116] 목재에 대해서는 상대적으로 연구 결과가 적은

편이다[117]. 그러나 바이오매스의 종류에 상관없이 효소 가수분해의 속도를 증가시키는데 효과적인 것으로 보고되었다.

과산화수소의 분해반응은 알칼리 조건에서 활발하고 산성에서는 상대적으로 안정하게 존재한다. 따라서 과산화수소에 의한 리그닌의 탈중합 반응 또한 반응물의 pH 에 큰 영향을 받는데, 알칼리 과산화수소 전처리를 위한 최적 pH는 11.5로 알려져 있다.

앞선 실험에서는 높은 pH 조건에서 과산화수소를 이용하여 개미산 처리된 목질 시료로부터 탈포르밀 및 탈리그닌 효과를 확인하였고 높은 수율로 포도당을 회수하였다. 이로부터 처음부터 개미산 공정을 배제하고 과산화수소만을 이용하여 리그닌을 분획하고 당의 소화율을 높이하고자 하는 탐구를 시작하였다. 최근 Lucas 등[118]은 실온에서 망간(III) 아세테이트 촉매 하에 섬유소계 바이오매스로부터 리그닌을 분획할 수 있음을 보고하여 과산화수소 전처리법의 새로운 가능성을 제시하였다. 그러나 라만 분석을 통해 탈리그닌의 정성적인 결과만을 보였을 뿐 조성분석을 통한 리그닌의 정량적인 제거율은 제시되지 않았다. 본 연구에서는 새롭게 제시한 과산화수소 전처리 방법을 바탕으로 리그닌의 제거율을 정량적으로 제시하고 실제 섬유소계 바이오매스의 전처리 및 효소 당화에 어떤 영향을 미치는가에 대한 실증적인 연구를 진행하였다. 원시료 뿐만 아니라 아임계수 전처리한 시료에도 같은 방법을 적용하여 리그닌 분획 공정으로서의 가능성에 대해 살펴보았고 그에 따른 효소 당화율을 비교하였다.

## 4.2. 재료 및 장치

### 4.2.1. 원료 물질 및 시약

백합나무 시료는 2.2.1 절에서 소개한 바와 마찬가지로 다양한 크기를 가진 목분의 형태로 뉴트라팜(주)으로부터 공급받아 사용하였다. 백합나무 목분은 추가적인 분쇄와 분체 과정을 거쳐 최종적으로 0.25~0.42 mm 의 크기를 가지는 입자로 선별하였고, 1:2 부피 비율의 에탄올-벤젠 용액을 이용한 속실렛 추출을 통해 지질이나 클로로필 등 후속 분석 과정의 방해 요소가 될 수 있는 물질들을 추출하였다. 추출물이 제거된 백합나무 목분은 잔류 유기용매의 제거를 위해 45 °C 의 진공 오븐에서 건조하였다. 건조가 끝난 목분은 실험에 사용되기 전까지 상온의 데시케이터에 보관하였고 평균 함수율은 5% 이내로 유지하였다. 본 실험에서는 백합나무 탈지 시료와 아임계수 전처리한 고상 시료 모두를 과산화수소 전처리 성능 평가에 이용하였다.

전처리 과정에서 탈리그닌을 위한 산화제로서 과산화수소(34.5%)를 삼전화학으로부터 구입하여 사용하였다. 촉매로는 망간(III) 아세테이트를 사용하였고, 그 외에 HPLC 분석에 필요한 표준 물질들은 모두 Sigma-Aldrich 에서 구입하였다.

실험에 사용한 개미산(99%), 염산(35-37%), 수산화나트륨(ultra-pure grade), 과산화수소(34.5%) 는 모두 삼전화학으로부터 구입하였다. HPLC 분석에 필요한 표준 물질들은 Sigma-Aldrich 를 통해 구입하여 사용하였다. 그림 4-1 에 본 실험에서 사용된 과산화수소와 망간(III) 아세테이트의 구조식을 나타내었다.

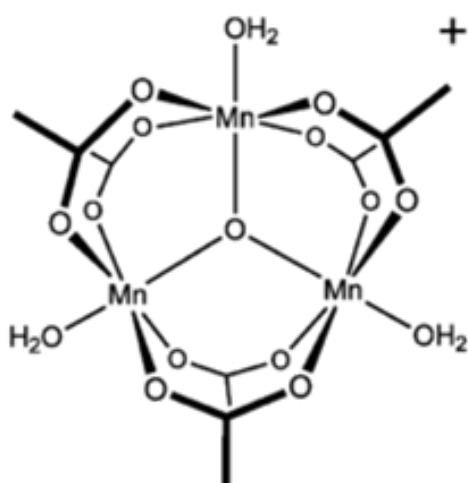
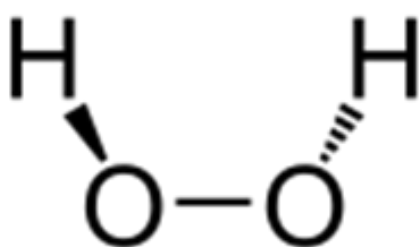


그림 4-1. 과산화수소(위)와 망간(III) 아세테이트(아래)의 구조식

#### 4.2.2. 실험 장치

아임계수 전처리는 앞에서의 실험과 마찬가지로 그림 2-3 에 나타난 것과 같은 316 형 스테인리스 강으로 주문 제작된 23.6 ml 부피의 회분식 반응기를 이용하였다. 열원으로는 그림 2-4 에 나타난 용융염조를 이용하여 실험을 진행하였다.

과산화수소 전처리는 다양한 온도에 따라 진행되었는데 서로 다른 온도에서의 동시 실험 진행을 위해 각각 다른 장치를 이용하였다. 50 °C 의 반응은 인큐베이터(WiseCube WIS-20, 대한과학)를 이용하였고 80 °C 의 반응은 항온 수조((WiseBath WVB-30, 대한과학)를 이용하였다. 121 °C의 실험은 오토클레이브(WiseClave WACS-1045, 대한과학)를 이용하였다. 모든 장치는 외기가 차단되며 항온 기능이 있기 때문에 반응 시간 내내 온도가 설정한대로 유지되는 것으로 가정하였고, 교반은 하지 않았다. 모든 실험 바이알이 최대한 공평한 상태가 되도록 항온 수조의 경우 바이알을 물에 잠기지 않는 위치에 두고 실험을 진행하였다.

### 4.3. 실험 및 분석

#### 4.3.1. 아임계수 전처리

과산화수소 전처리에 사용할 아임계수 전처리 고상 시료의 확보를 위해 200 °C에서 10 min(가혹성 계수 3.94) 동안 아임계수 가수분해를 진행하였다. 앞선 실험과 마찬가지로 회분식 반응 시스템을 이용하였고, 전체적인 실험은 2.3.1. 절에서 설명한 것과 같은 순서에 따라 진행되었다. 반응이 끝나고 반응기를 냉각시킨 후 반응물들을 앞에서 설명한 것과 같은 방법으로 액상과 고상으로 분리하였다. 과산화수소 실험을 위해서는 고상 시료만이 이용되었다. 이렇게 얻어진 고상 시료는 정확한 정량 분석을 위해 105 °C의 오븐에서 하룻동안 건조시킨 뒤 무게를 측정하였다.



#### 4.3.2. 과산화수소 전처리

과산화수소 전처리 실험의 순서는 전체적으로 Lucas 등[118]이 제안한 방법에 의거하여 진행하였으나 본 연구실의 상황에 맞게 일부 조정을 하였다. 실험 조건은 표 4-1에 요약하여 나타내었다.

우선 40 ml 용량의 바이알에 15 ml의 증류수와 270 mg의 망간(III) 아세테이트를 차례로 넣어주었다. 망간(III) 아세테이트는 본래 갈색을 띠며 초산 냄새가 나는 분말 형태를 띠고 있었으나 물에 넣었을 때는 검은 색을 띠면서 바닥에 침전하는 것이 관찰되었다. 이 용액에 4.35 ml의 과산화수소를 천천히 첨가하였다. 이때 용액에서 거품이 격렬하게 생성되면서 침전되어 있는 망간(III) 아세테이트 입자가 용해되는 것이 관찰되었다. 망간(III) 아세테이트가 다 용해된 용액의 색은 무색 투명하였다.

바이오매스 시료로는 전처리하지 않은 백합나무 목분과 200 °C에서 10 min 동안 아임계수로 전처리하여 헤미셀룰로오스가 대부분 제거된 고상 시료, 이렇게 두 가지를 이용하였다. 준비된 용액에 500 mg의 바이오매스 시료를 넣고 약하게 교반해준 후 각 온도에 맞는 장치에 두고 7 일 동안 방치하였다. 실온에서 반응시킨 시료는 실온의 테시케이터에 두었고 이때 최대 온도는 30 °C를 넘지 않았다. 50 °C의 반응은 인큐베이터, 80 °C의 반응은 항온 수조에서 각각 이루어졌다. 한편 121 °C의 반응은 아임계수 전처리 시료에 대해서만 행하였으며 오토클레이브에서 2 h 동안 처리한 후 꺼내어 실온의 시료와 동일하게 테시케이터에서 반응을 진행하였다. 전처리 반응 진행 시 기체의

발생으로 인해 내부 압력이 높아져 바이알이 깨지는 것을 막기 위해 바이알 입구는 약간 느슨하게 닫아주었다.

각 시료는 24 h 마다 꺼내어 겉모습의 변화를 사진으로 기록하여 관찰하였고, 최종적으로 7 일째 되는 날 반응을 멈추고 분석을 위해 시료를 회수하였다. 전처리된 시료는 1G4 유리 필터를 이용하여 진공 하에서 여과시켜 액상과 고상으로 분리하였다. 고상 시료에 잔류하는 수용성 반응 생성물들을 씻어내기 위해 80 °C로 가열한 증류수를 이용하여 pH 가 중성이 될 때까지 충분히 씻어 주었다. 이렇게 얻어진 고상 시료는 105 °C의 오븐에서 건조한 뒤 그 무게를 측정하였다.

아임계수 공정과 과산화수소 공정을 포함한 전체 실험의 순서도를 그림 4-2 에 나타내었다.

표 4-1. 과산화수소 전처리 공정의 반응 조건

증류수 양	15 ml
과산화수소 양	4.35 ml
망간(III) 아세테이트 양	270 mg
시료의 종류	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전처리하기 전 백합나무 목분</li> <li>- 아임계수(200 °C, 10 분) 전처리된 백합나무 고상 시료</li> </ul>
시료의 양	500 mg
반응 온도	실온(RT) 50 °C 80 °C 120 °C(아임계수 처리 시료만 해당)
체류 시간	7 일(121 °C는 2 시간 반응 후 실온에서 7 일)

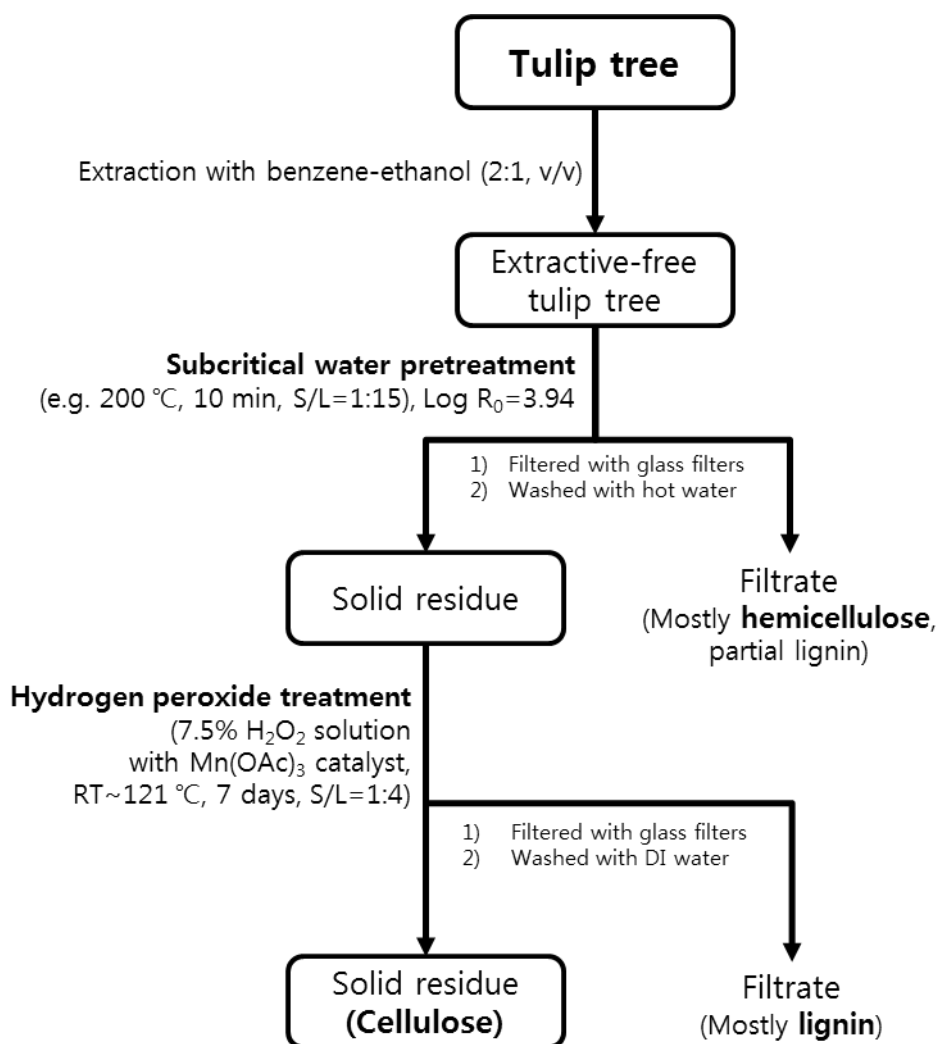


그림 4-2. 아임계수 + 과산화수소 전처리 공정의 순서도

#### 4.3.3. 효소 당화

전처리 과정에 따른 효소 당화율의 변화 양상을 관찰하기 위하여 전처리하기 전 고상 시료, 아임계수 전처리된 고상 시료, 반응 조건 별로 과산화수소 전처리한 고상 시료를 각각 기질로 삼아 효소 당화를 진행하였다.

당화 실험을 위해 앞에서 언급했던 Celluclast 1.5L 과 Novozyme 188, 두 가지 종류의 상용 효소를 이용하였다(그림 2-5). 투입한 효소의 양은 Celluclast 1.5L 의 경우 5 FPU/g cellulose, Novozyme 188 은 10 CBU/g cellulose 로 설정하였고 전체적인 효소 당화 실험의 순서는 앞에서 설명한 것과 같은 방법을 따랐다. 효소 당화 실험 조건은 표 4-2 에 요약하여 나타내었다.

효소 당화는 48 h 에 걸쳐 진행되었고 분석을 위해 정해진 시간마다 당화액으로부터 0.5 ml 의 시료를 채취하여 0.2  $\mu$ m 크기의 주사기 필터를 이용하여 여과시켰다. 여과시킨 용액은 바이알에 담아 HPLC 로 정량 분석을 진행하였다. 당의 분석을 위해 굴절률 검출기와 300 mm x 7.8 mm 크기의 Aminex HPX-87P 컬럼 을 사용하였다. 분석 온도와 시간은 각각 80  $^{\circ}$ C, 30 min 이었고 이동상으로는 물을 0.6 ml/min 의 유량으로 흘려주었다.

표 4-2. 아임계수 + 과산화수소 전처리 고상 시료의 효소 당화 조건

Sample	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Untreated TL</li> <li>- Hydrogen peroxide pretreated solid</li> </ul>
Biomass loading	2 %(oven dry wt. substrate/vol. of buffer)
Enzyme loading	Celluclast 1.5L: 5 FPU/g substrate Novozyme 188: 10 CBU/g substrate (CBU/FPU = 2:1)
Buffer solution	pH 4.8, 5mM sodium citrate buffer
Incubation temp.	50 °C
Shaking	150 rpm
Reaction time	48 h
Total volume	10 mL

#### 4.3.4. 전처리 생성물의 분석

##### 고상 수율 (Solid yield)

먼저 시료에 포함되어 있는 수분을 제거하기 위하여 일정량의 시료를 미리 무게를 측정한 은박접시 위에 덜어 105 °C의 오븐에서 24 h 동안 건조시켰다. 건조된 시료를 오븐에서 꺼낸 후 바로 무게를 측정하면 공기 중의 수분이 다시 흡수되기 쉬우므로 영향을 최소화하기 위해 데시케이터에서 방냉한 후 무게를 측정하였다. 시료의 건조 전, 후의 무게를 알면 함수율을 구하여 오븐 건조 무게(oven dry weight, ODW)를 알 수 있다.

고상 수율은 전처리 전의 바이오매스와 전처리 후에 얻어진 고상 시료의 오븐 건조 무게를 이용하여 아래의 식과 같이 계산할 수 있다.

$$\text{고상 수율 (\%)} = \frac{\text{아임계수 전처리된 고상 시료의 건조 무게 (g)}}{\text{아임계수 전처리 전의 백합나무 목분의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

##### 화학 조성 (Chemical composition)

먼저 건조된 시료 0.1 g 에 72% 황산 1ml 을 넣고 유리 막대로 잘 교반해주며 30 °C의 온도의 항온수조에서 2 h 동안 가수분해시킨다. 여기에 28 ml 의 증류수를 첨가하여 황산의 농도가 4%가 되도록 한 후 121 °C의 오토클레이브 에서 1 h 동안 처리한다. 여기서 얻어진 가수분해 용액은 냉각시킨 후 1G4 유리 필터를 이용하여 진공 여과시킨다. 유리 필터에 남은 흑갈색의 고체 찌꺼기는 산 불용성 리그닌으로 105 °C의 오븐에서 24 h 동안 건조시킨 후 무게를 재어 그 양을 측정하였다. 산 불용성 리그닌의 함량은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{산 불용성 리그닌 함량 (\%)} = \frac{\text{필터에 남은 리그닌의 건조 무게 (g)}}{\text{가수분해 전 시료의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

산 가용성 리그닌의 함량은 진공 여과 과정에서 미리 액상 가수분해물 여과액의 부피를 측정한 뒤 UV-Vis 분광기를 이용하여 240 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 구하였다. 이때 여과액의 흡광도가 0.7~1.0 사이가 되도록 증류수로 희석해 가면서 측정한다. 산 가용성 리그닌의 함량은 다음과 같은 식에 의해 구하였다.

산 가용성 리그닌 함량 (%)

$$= \frac{\text{UV 흡광도} \times \text{여과액 부피 (ml)} \times \text{희석 배수}}{\epsilon \times \text{가수분해 전 시료의 건조 무게 (g)}} \times 100\%$$

여과액의 일부는 가수분해되어 생성된 단당류와 유기산 등의 정량 분석에 사용되었다. 당과 유기산의 분석에는 HPLC 가 사용되었다. 검출기로는 굴절률 검출기가 사용되었으며 300 mm x 7.8 mm 크기의 Aminex HPX-87P 컬럼과 Aminex HPX-87H 컬럼이 각각 당과 유기산의 분석을 위해 사용되었다. 당 분석을 위해서는 물을 이동상으로 사용하였고 분석 온도와 시간은 각각 80 °C, 30 min 으로 하였다. 유기산 분석의 경우 이동상으로는 5 mM 황산 수용액을 사용하였고 60 °C에서 0.6 ml/min 의 유량으로 흘려주었다.

## X 선 회절 분석 (XRD)

Cu K<sub>α</sub> 를 방사선원으로 하고 흑연 단색화 장치를 이용하는 일본



Rigaku 사의 X 선 회절 분석기를 이용하여 고상 시료의 결정성을 측정하였다. 회절 패턴은 10~40°의 2θ 범위에서 기록되었고, 1°/min 의 스캔 속도로 0.02°마다 측정하였다. 가동 전압과 가동 전류는 각각 50 kV 와 200 mA 로 하였다.

X 선 회절 분석의 결과를 이용하여 바이오매스의 결정화도(CrI)를 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$\text{CrI (\%)} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100\%$$

#### 전계방출 주사전자현미경 (SEM)

전처리 전후의 바이오매스 표면 형태와 구조의 변화를 보기 위하여 전계방출 주사전자현미경을 이용한 관찰을 수행하였다. 건조된 고상 시료를 스테르브에 미리 붙여둔 카본 테이프 위에 잘 펴 바르며 부착시켰다. 카본 테이프 위에 제대로 부착되지 않은 시료는 분석 시 기기를 손상시킬 수 있으므로 바람을 불어 날려주었다. 준비된 시료는 전도성을 부여하기 위해 백금 코팅을 한 후 기기에 넣고 다양한 배율로 표면을 관찰하였다.

## 4.4. 결과 및 고찰

### 4.4.1. 전처리 시료의 수율 및 조성 변화

각 전처리 과정에 따라 고상 시료의 수율과 화학 조성이 어떻게 변하는지를 살펴보기 위하여 조성 분석을 실시하였다. 전처리 하기 전의 백합나무 탈지 시료는 TL, 아임계수 전처리한 시료는 SW, 백합나무 탈지시료를 과산화수소 처리한 시료는 반응 온도에 따라 각각 RT(실온), 50(50 °C), 80(80°C)으로 표기하였다. 아임계수 전처리 시료를 과산화수소 처리한 시료는 반응 온도에 따라 각각 HP\_RT(실온), HP\_50(50 °C), HP\_80(80 °C), HP\_121(121 °C)로 표기하였다.

#### 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리에 따른 수율 및 조성 변화

우선 백합나무 탈지 시료를 바로 과산화수소로 전처리하여 고상 수율과 화학 조성을 분석하였고, 그 결과를 표 4-3 에 요약하여 나타내었다. 전처리된 시료의 고상 수율은 온도가 증가할수록 증가하는 것으로 나타났는데, 일반적으로 온도가 상승할수록 고상 수율이 감소하는 다른 전처리 공정들과는 다른 결과를 보였다. 또한 각 물질 별 화학 조성에 있어서도 흥미로운 결과를 보였다. 전처리 결과 온도가 증가할수록 자일란과 산 불용성 리그닌의 비율은 감소하였으나 클루칸과 산 가용성 리그닌의 비율은 증가하는 경향을 보였다. 이는 글루칸과 산 가용성 리그닌이 상대적으로 과산화수소 전처리에 높은 저항성을 가졌기 때문으로 사료된다.

고상 수율과 화학 조성 비율을 곱하여 실제 과산화수소 전처리 후 남은 각 물질의 양 및 TL 대비 제거율을 계산해 보았다. 클루칸의 경우 RT 에서 약 35%가 손실되는데 반해 50 에서는 약 27%, 80 에서는 약 18%의 손실률을 보여 온도가 증가할수록 전처리에 의한 당 손실이 적음을 확인하였다. 헤미셀룰로오스의 주성분인 자일란은 클루칸과는 다른 경향을 보였는데 80 에서 97%에 가까운 자일란이 제거된 반면, RT 에서는 74%가 제거되어 상대적으로 낮은 제거율을 보였다. 전체 헤미셀룰로오스 구성 당의 함량을 기준으로 살펴보면 그림 4-3 과 같이 최대 92.8%의 헤미셀룰로오스가 분획되는 것을 알 수 있다.

리그닌의 경우는 산 가용성 리그닌과 산 불용성 리그닌의 반응 거동이 다르게 나타났는데, 산 가용성 리그닌의 제거율은 80 에서 약 32%로 가장 높았고 50 에서 약 21%로 가장 낮았다. 반면 산 불용성 리그닌의 제거율은 50 에서 약 73%로 가장 높았고, 30 에서 약 47%로 가장 낮았다. 전체 리그닌의 양을 고려했을 때는 50 과 80 에서 약 60%의 비슷한 리그닌 제거율을 보였다. 전처리 온도에 따른 리그닌의 제거율을 그림 4-4 에 나타내었다.

실험 결과로 볼 때 망간(III) 아세테이트 촉매 하에 과산화수소로 전처리 하는 방법은 Lucas 등이 주장한 것처럼 탈리그닌에 상당한 효과를 보이는 것으로 나타났다[118]. 뿐만 아니라 헤미셀룰로오스의 분획에도 탁월한 효과를 보였으며 오히려 리그닌에 비해 더 높은 결과를 보여주었다. 또한 실온보다는 좀 더 높은 온도에서 반응시킬 경우 헤미셀룰로오스와 리그닌 제거율, 셀룰로오스의 손실 등의 측면에서 더 나은 효과를 기대할 수 있었다.

표 4-3. 백합나무 탈지 시료의 조건 별 과산화수소 전처리 고상 수율과 화학 조성 변화

물질	TL 대비 고상 수율 (%)	화학 조성 (%)						
		Glu	Xyl	Gal	Ara	Man	KL	ASL
TL	100	45.9	14.3	2.7	nd	2.1	20.7	5.7
RT	58.1	51.5	6.5	nd	nd	1.1	18.9	7.2
50	61.4	54.5	2.8	nd	nd	2.0	8.9	7.3
80	65.2	57.7	0.6	nd	nd	1.5	11.8	5.9

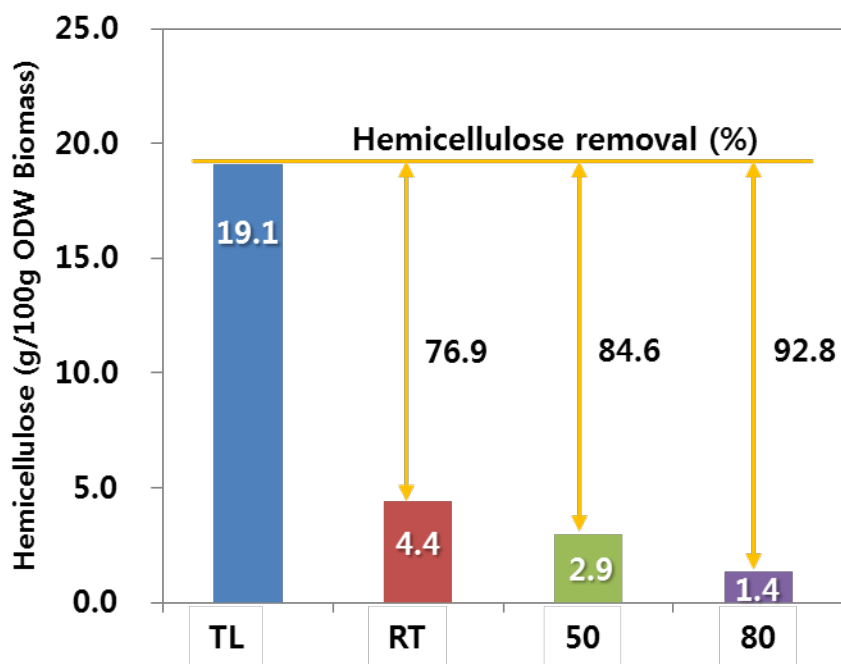


그림 4-3. 과산화수소 전처리 온도에 따른 백합나무 탈지 시료의  
헤미셀룰로오스 제거율 비교

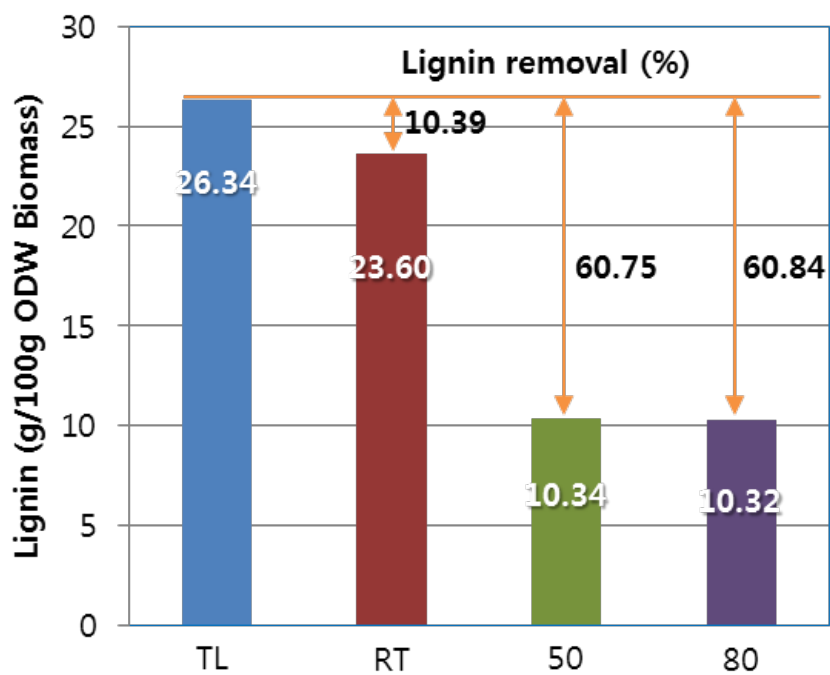


그림 4-4. 과산화수소 전처리 온도에 따른 백합나무 탈지 시료의 리그닌 제거율 비교

## 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리에 따른 수율 및 조성 변화

일차적으로 아임계수 전처리를 거친 백합나무 고상 시료를 가지고 앞에서와 동일한 방법으로 과산화수소 전처리를 실시하였고 그 결과를 표 4-4 에 나타내었다. 앞에서 온도의 증가에 따라 리그닌과 헤미셀룰로오스의 분획률이 높아지는 것을 확인한 바 있다. 따라서 본 실험에서는 121 °C에서 추가적인 실험을 진행하였다. 온도가 증가함에 따라 과산화수소의 분해로 인한 기포의 생성이 격렬하게 일어났기 때문에 다른 실험과 달리 121 °C에서는 2 h 동안만 반응시킨 후 꺼내어 나머지 시간 동안 실온에서 반응시켰다.

SW 를 이용한 과산화수소 전처리 시료의 고상 수율은 반응 온도가 증가함에 따라 감소하였는데, 백합나무 탈지 시료를 이용한 앞선 실험과는 상반되는 결과를 보였다. 이는 아임계수 전처리로 인해 생긴 바이오매스의 물리, 화학적 변화가 후속 과산화수소 전처리 공정에 영향을 준 것으로 파악된다. 그러나 구체적인 원인을 파악하기 위해서는 추가적인 분석과 고찰이 필요하다. 전처리된 고상 시료의 화학 조성은 앞선 실험과 비슷한 양상을 나타냈다. 헤미셀룰로오스는 앞선 아임계수 전처리를 통해 많은 양이 분획되었기 때문에 추가적인 분획 정도가 뚜렷하게 나타나지 않았으나 산 불용성 리그닌의 경우는 상당한 정도의 분획률을 보였다. 반면 HP\_121 은 모든 면에서 나머지 시료들과는 다른 경향을 나타내었다.

셀룰로오스의 경우 전처리 온도에 따라 시료내 비율이 증가하는 경향을 보였으며 전처리 후 최대 손실률은 HP\_RT 에서 SW 대비 16%를 기록하였다. 과산화수소 전처리시 발생하는 셀룰로오스의 손실

원인은 앞선 아임계수 전처리에서의 셀룰로오스 손실 원인과는 다른 측면에서 생각해볼 수 있다. 아임계수 전처리를 통해 제거되는 셀룰로오스의 대부분은 결정성 셀룰로오스에 비해 낮은 온도의 물에 용해되는 비결정성 셀룰로오스이다[77]. 따라서 아임계수 전처리를 거친 바이오매스를 구성하는 셀룰로오스는 대부분 결정성 셀룰로오스이다. 반면 과산화수소 전처리의 경우 그림 4-5 의 b, e, h 에서 보듯 세포벽 사이에 존재하는 리그닌과 헤미셀룰로오스의 제거로 인해 섬유소가 미세한 조각의 형태로 떨어져 나오는 것이 관찰되었는데 이러한 현상이 셀룰로오스 손실의 한 원인이 아닌가 생각된다[118]. 실제로 전처리 직후 분리된 액상 시료는 무색 또는 황색의 투명한 액체 상태이나 시간이 지나면서 하얀 침전물이 생기는 것을 확인할 수 있었다. 이는 선행 연구에서 보고된 것과도 일치하는 결과로 셀룰로오스의 미세 조각들이 액상 시료에 일부 포함되어 있다는 가설을 뒷받침해준다. 백합나무 탈지 시료의 셀룰로오스 손실율이 아임계수 전처리의 그것에 비해 높게 분석된 것도 같은 맥락에서 생각해볼 수 있다.

본 실험의 주요 목표인 리그닌 분획 성능을 평가하기 위해 전처리 조건 별 리그닌 제거율을 계산하여 그림 4-6 과 4-7 에 나타내었다. 그림 4-6 에서는 아임계수 전처리 시료에 대한 과산화수소 전처리 공정의 탈리그닌도를 나타내었는데, 80 ℃에서 전처리한 경우 약 78%의 가장 높은 리그닌 제거율을 나타내었다. 이를 원시료 대비로 환산하면 그림 4-7 에 나와 있듯이 약 91%의 리그닌 제거율을 나타내었다.



표 4-4. 아임계수 전처리 시료의 조건 별 과산화수소 전처리 고상 수율과 화학 조성 변화

물질	TL 대비 고상 수율 (%)	SW 대비 고상 수율 (%)	화학 조성 (%)						
			Glu	Xyl	Gal	Ara	Man	KL	ASL
TL	100	–	45.9	14.3	2.7	nd	2.1	20.7	5.7
SW	63.1	100	52.4	4.9	nd	nd	3.1	15.3	2.6
HP_RT	52.1	82.6	53.3	2.6	nd	nd	0.7	9.5	2.9
HP_50	41.7	66.1	70.4	3.0	nd	nd	2.1	4.8	1.4
HP_80	39.9	63.2	71.2	2.9	nd	nd	2.0	5.0	1.2
HP_121	42.2	66.9	68.3	2.7	nd	nd	1.6	5.8	1.5

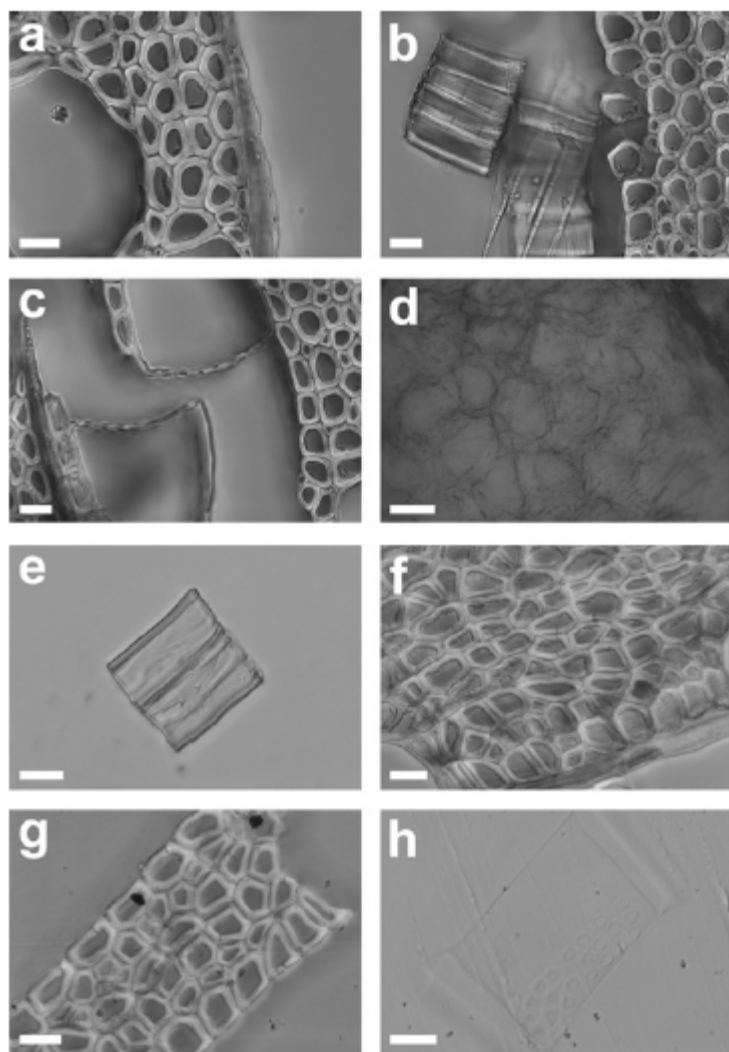


그림 4-5. 과산화수소 전처리된 포플러 절편의 시간에 따른 광학  
현미경 사진[118]

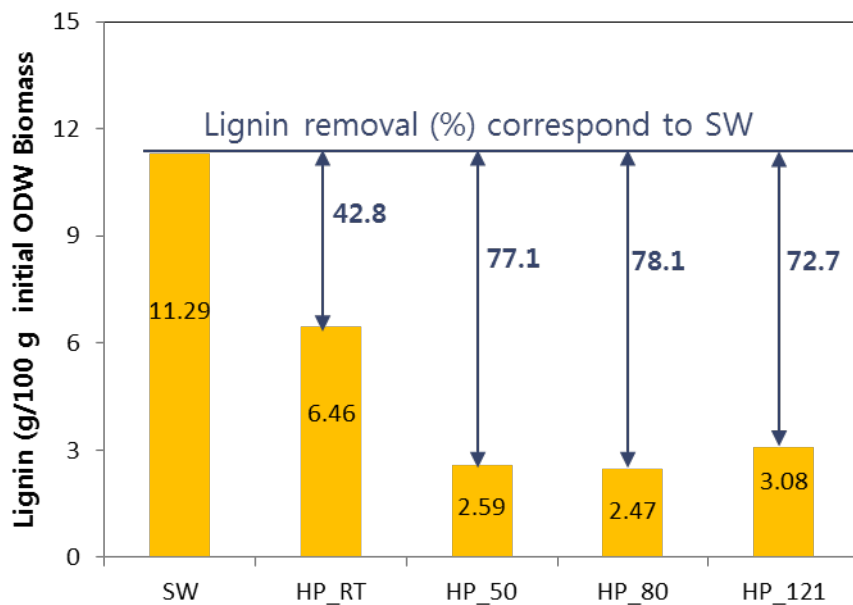


그림 4-6. 아임계수 전처리 시료 대비 과산화수소 전처리 시료의 리그닌 제거율 비교

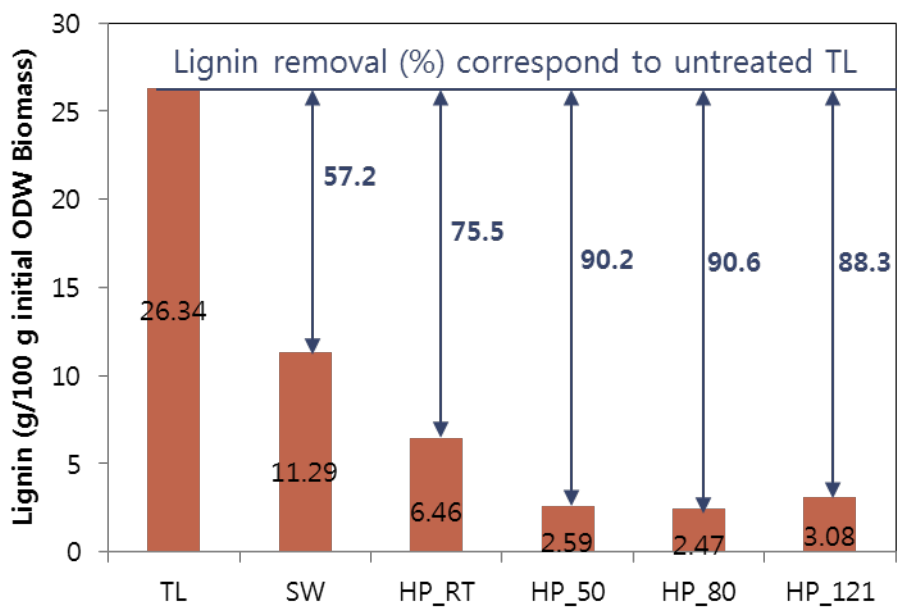


그림 4-7. 백합나무 탈지 시료 대비 아임계수와 과산화수소 전처리 시료의 리그닌 제거율 비교

#### 4.4.2. 전처리 시료의 물리화학적 특성 변화

##### 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리에 따른 물리화학적 특성 변화

TL 의 과산화수소 전처리 온도와 시간에 따른 색상 변화를 그림 4-8 에 나타내었다. 실험에 사용된 망간(III) 아세테이트는 물 속에서 검은색 침전을 형성하다가 과산화수소를 첨가하면 용해되면서 무색의 투명한 용액이 된다. 이러한 색상 변화는 용액 중에 녹아 있는 망간이 2 가 망간의 형태로 존재함을 암시한다[119]. Davies 등[120]은 산성 조건에서 과산화수소의 존재 하에 3 가 이상의 원자가수를 갖는 망간이 2 가로 환원됨을 밝힘으로써 이를 설명하였다. 실험 결과 실온과 50 °C에서는 시간이 지나도 원래 용액의 색상처럼 무색 투명하게 유지되었으나 80 °C의 조건에서는 반응 초기부터 비교적 격렬한 기포의 생성을 관찰할 수 있었고 시간이 지남에 따라 용액의 색상도 점점 갈색 빛을 띠었다. 그러나 다른 조건에서와 마찬가지로 용액이 탁해지는 현상은 관찰되지 않았다.

80 °C의 조건에서는 7 일이 지난 후에 더 이상의 기포 생성이 관찰되지 않았으나 실온과 50 °C 조건에서는 7 일이 지난 후에도 약간의 기포가 생성되는 것이 관찰되었다. 이는 망간(III) 아세테이트 촉매 하에서 과산화수소의 분해 또는 불균화(disproportionation) 반응이 매우 천천히 일어나는 것을 보여준다.

넣어준 바이오매스 고상 시료의 색은 실온과 50 °C 조건의 경우 시간이 지날수록 점점 밝은 색을 띠었고 80 °C 조건에서는 반대로 점점 짙은 갈색으로 변하였다. 과산화수소에 의한 표백 효과는 특히

50 °C에서 두드러지게 관찰되었는데 최종적으로 반응이 끝난 후 분리된 고상 시료의 색을 비교해보면 색상의 차이가 확연하게 드러난다(그림 4-9). 80 °C의 조건에서는 얻어진 고상 및 액상 시료의 색이 아임계수로 전처리한 시료의 색과 유사하였으나 액상의 경우 탁하고 작은 입자들이 침전되는 아임계수 전처리 시료와는 달리 투명한 갈색 빛을 나타내었다. 높은 온도에서 액상 시료의 색이 갈색으로 변하는 원인은 아직 분명치 않으나 아마도 과산화수소에 의한 산화와 더불어 망간(III) 아세테이트로 인해 용액 중에 존재하는 초산에 의한 산 가수분해가 추가로 일어났을 것으로 추측된다.

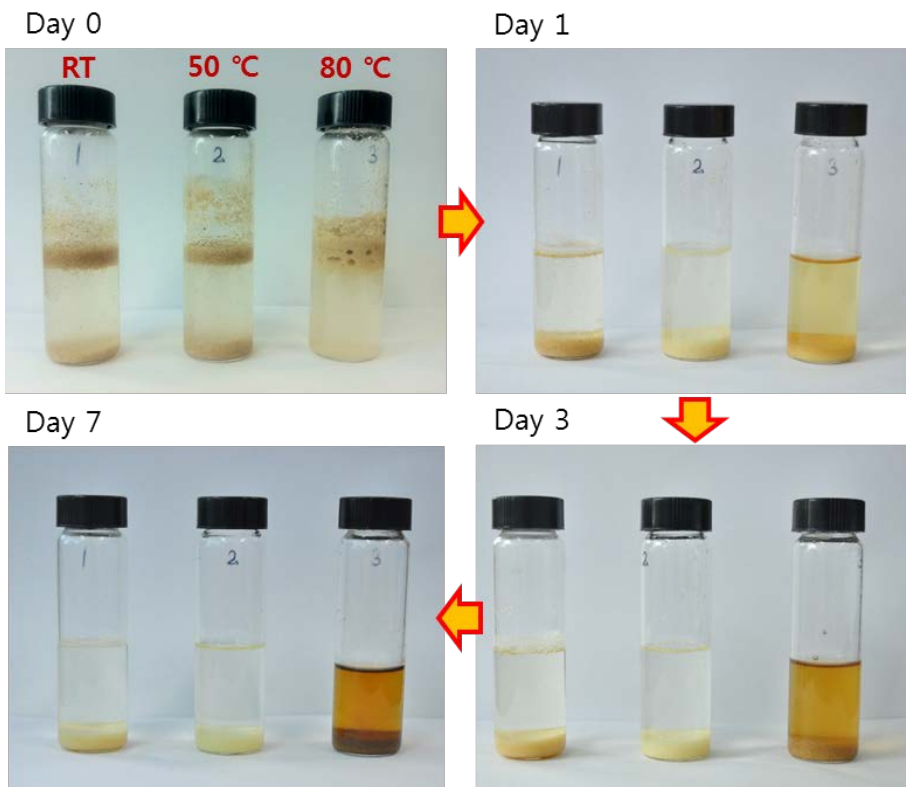
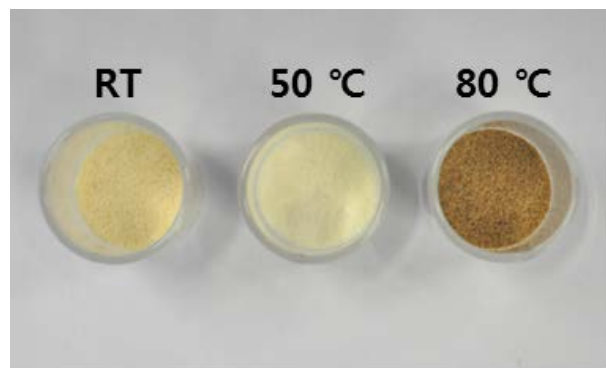
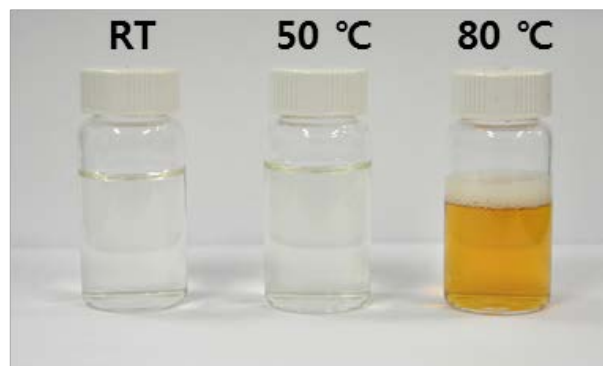


그림 4-8. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 시간에 따른 색상 변화 비교



**Solid portion**



**Liquid portion**

그림 4-9. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리에 따른 고상과 액상 시료의 색상 비교



그림 4-10 에 TL 과 TL 의 과산화수소 전처리로 얻은 고상 시료의 미세 구조 변화를 비교하기 위하여 500 배로 확대한 SEM 사진을 나타내었다. RT 와 80 의 경우 겉모습에서 TL 과의 큰 차이점을 발견할 수 없었다. 50 °C에서 전처리한 고상 시료의 경우 겉보기에는 RT 와 비슷한 색상을 띠고 있었으나 입자보다는 섬유질에 가까운 형태로 변형된 것을 호가인할 수 있었다. 이를 SEM 사진을 통해 들여다보면, 50 의 경우 대부분의 입자 형태가 거의 완전히 붕괴되어 섬유와 같은 길다란 형태를 띠는 것을 알 수 있었다. 또한 TL 에서 흔히 관찰되는 기공 구조도 거의 관찰되지 않았다. 이는 앞에서도 언급했던 것처럼 세포벽 사이사이를 채우고 있던 리그닌과 헤미셀룰로오스의 용해로 인해 세포벽 사이의 결합력이 크게 약화되어 섬유 다발끼리 떨어져 나갔기 때문으로 추정해볼 수 있다. 그러나 시료들 간의 화학 조성에 크게 차이가 나지 않음에도 불구하고 50 °C의 온도에서만 이러한 섬유화 현상이 두드러지게 나타나는 원인은 아직 명확하지 않다.

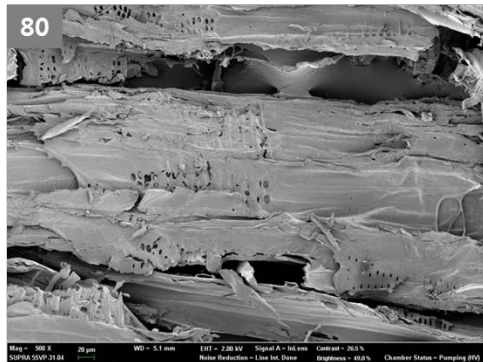
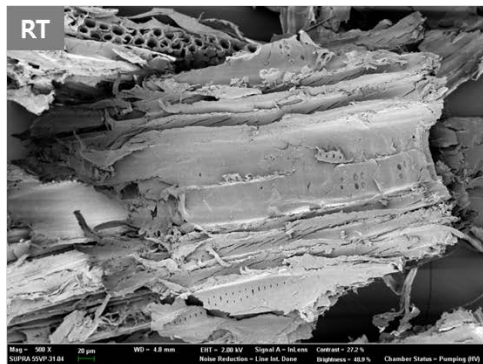


그림 4-10. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 표면 구조 변화

과산화수소 전처리 조건에 따른 바이오매스의 결정화도 변화를 비교하기 위해 XRD 분석을 실시하였고 그 결과를 그림 4-11 에 나타내었다. TL 에 비해 전처리 후 모든 조건에서  $I_{002}$  피크의 세기가 증가한 것을 확인할 수 있었으나 다른 전처리 공정에 비해서는 그 정도가 미미하였으며 피크의 폭도 상대적으로 크게 줄어들지 않았다. 그림 4-12 의 CrI 계산 결과는 XRD 피크의 모양 변화를 잘 대변하고 있다. CrI 의 최대값은 80 °C 전처리 시료에서 68.6%로 계산되었는데 아임계수나 개미산 전처리시 CrI 의 최대값이 거의 80%에 가까웠던 것을 생각해보면 상당히 낮은 결과이다. 과산화수소 전처리의 결과 리그닌과 헤미셀룰로오스의 제거율이 상당히 높음에도 불구하고 이러한 결과가 관찰된 것은 리그닌이나 헤미셀룰로오스와 같은 비결정성 물질의 감소 이외에 결정화도에 영향을 미치는 다른 원인이 작용하였음을 의미한다.

우선 본 실험의 반응 온도가 아임계수 전처리 온도에 비해 매우 낮으므로 셀룰로오스 중 비결정성인 부분들이 용해되지 않고 여전히 남아 있을 가능성을 들 수 있다. 또한 앞에서 설명하였듯이 과산화수소와 망간 촉매 하에서 리그닌과 헤미셀룰로오스의 산화와 용해로 인해 세포벽 간의 결합이 약해져 떨어져 나간 셀룰로오스로 인해 상대적으로 결정성 부분의 비중이 비결정성 부분에 비해 줄어들었을 수도 있다.

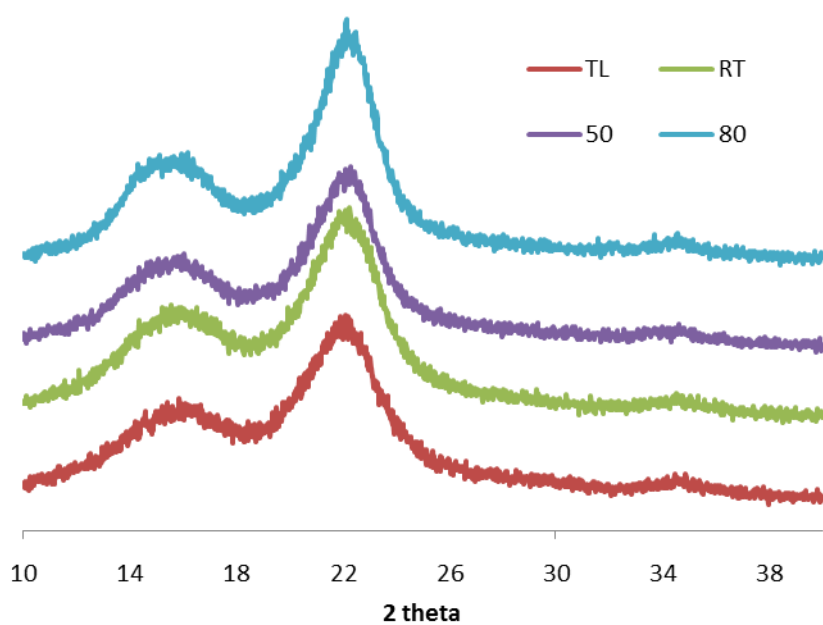


그림 4-11. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 XRD 분석 결과

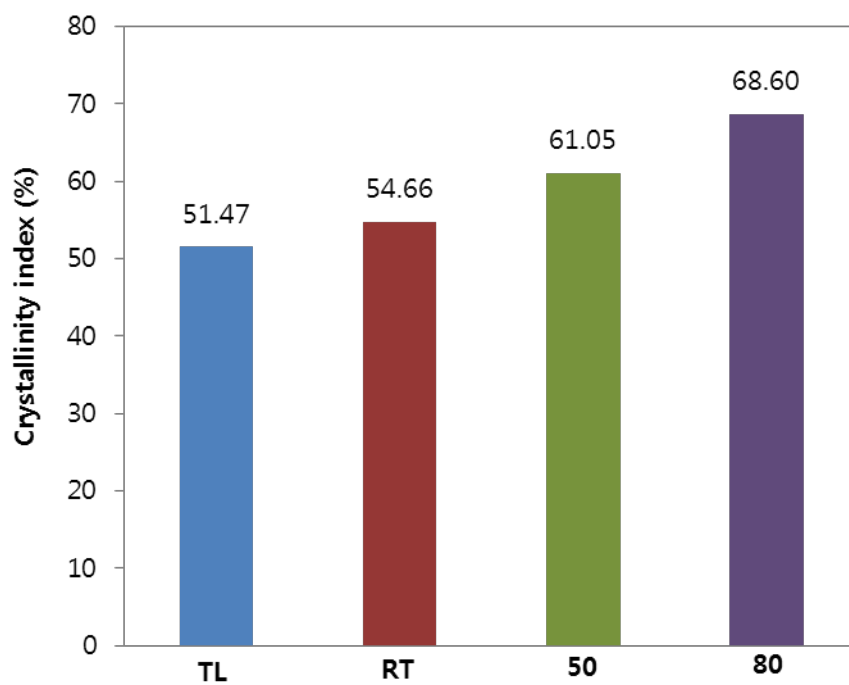


그림 4-12. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 결정화도 변화

## 아임계수 처리 시료의 과산화수소 전처리에 따른 물리화학적 특성 변화

아임계수 전처리를 통해 헤미셀룰로오스 분획 공정을 거친 시료로부터 리그닌을 분획하기 위하여 과산화수소 전처리를 실험을 실시하였다. 우선 반응 온도 별 시료의 겉모습 변화를 반응 시간에 따라 관찰하여 그림 4-13 에 나타내었다. 이전 실험과 마찬가지로 농도가 낮을수록 기포의 생성이 오랫동안 관찰되었다. HP\_121 의 경우 오토클레이브에서 꺼내어 실온에 방치한 이후로는 더 이상 기포의 발생이 관찰되지 않았다. 이로 미루어 보아 과산화수소의 분해 속도는 알려진 것처럼 용액의 pH 뿐만 아니라 반응 온도에도 의존함을 알 수 있다. pH 의 경우 촉매의 활성화에 영향을 주어 과산화수소의 불균일화 반응을 촉진함으로써 기포의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[118, 121].

넣어준 SW 는 초기에는 짙은 갈색을 띠고 있었으나 시간이 지남에 따라 점점 표백되면서 옅은 색으로 변하는 것을 관찰할 수 있었다. 이번에도 50 °C에서 전처리한 시료에서 가장 뚜렷한 표백효과가 관찰되었다. 반응이 끝나고 분리한 고상 시료의 색상을 그림 4-14 를 통해 비교할 수 있다. SW 와 비교했을 때 표백 효과가 확연히 드러나지만 TL 의 색보다 연해지지는 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 아임계수 전처리에 의해 발생한 어두운 색상을 띠는 물질(예: 유사리그닌)이 과산화수소 전처리를 통해서 완전하게 산화되어 제거되지 않음을 의미한다.

전처리 후 액상 시료의 색상 변화도 앞선 실험과 비슷한 양상을 보였다. 50 °C까지는 매우 옅은 투명 갈색 빛을 띠지만 그 이상의 온도

조건에서는 색상이 점점 짙은 갈색을 띠는 것이 명확하게 보였다. 특히 HP\_121 의 경우 초기 2 h 을 제외하고는 HP\_RT 와 동일한 조건에서 실험을 진행하였는데 전혀 다른 결과를 나타내었다. 이는 높은 온도로 인해 초기 과산화수소의 소비량이 많았고, 초산의 존재로 인한 산 가수분해는 상대적으로 촉진되었기 때문인 것으로 해석된다.

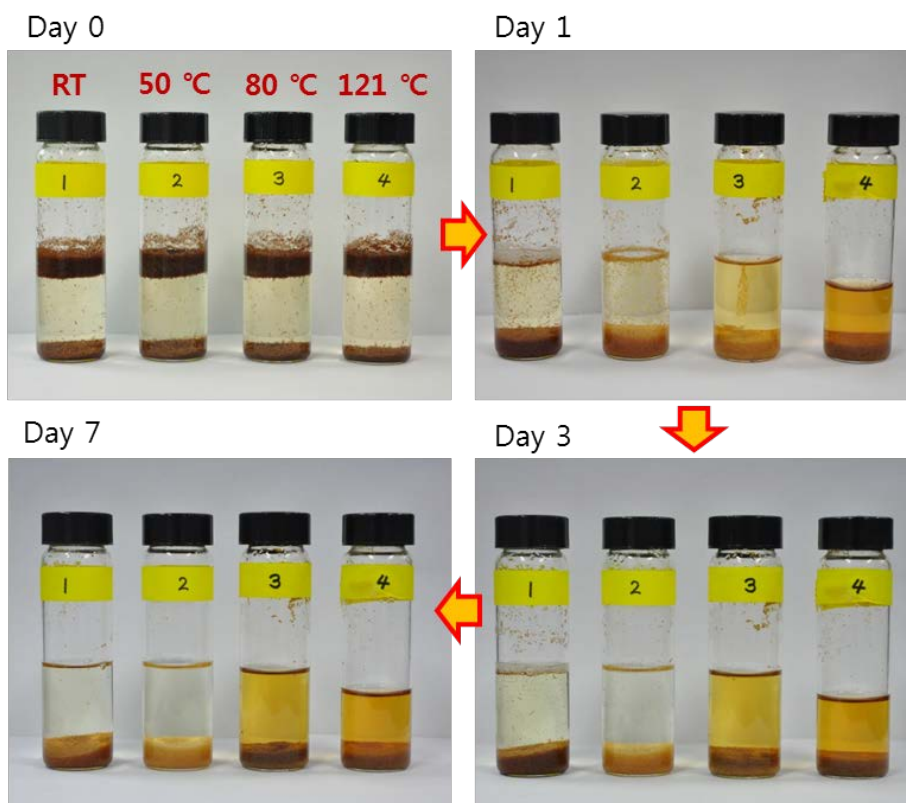


그림 4-13. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 시간에 따른  
색상 변화 비교



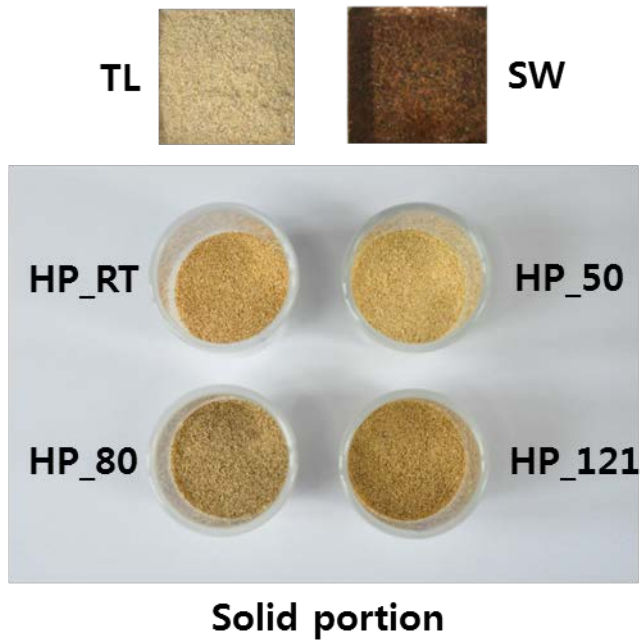


그림 4-14. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리에 따른 고상과 액상 시료의 색상 비교  
(RT 액상 시료의 경우 촬영 전 부주의로 인해 시료가 손실됨)

그림 4-15 에는 다양한 온도에서 SW 를 과산화수소로 전처리한 고상 시료의 표면 및 미세구조를 TL 및 SW 와 비교하여 나타내었다. 과산화수소 전처리 결과 일부 섬유화 되었거나 섬유화가 진행되고 있는 입자들이 발견되기는 하였으나 TL 의 과산화수소 전처리 시료와 비교했을 때 그 정도가 미미하였다. 이는 아임계수 전처리 과정에서 생긴 어떤 변화에 의해 바이오매스 입자의 섬유화가 방해를 받는 것으로 생각해볼 수 있다. 대표적으로 유사리그닌의 생성이나 아임계수 전처리 후 건조과정에서 발생하는 섬유 각질화와 같은 현상을 들 수 있으나 정확한 원인 파악을 위해서는 추가적인 규명이 필요하다.

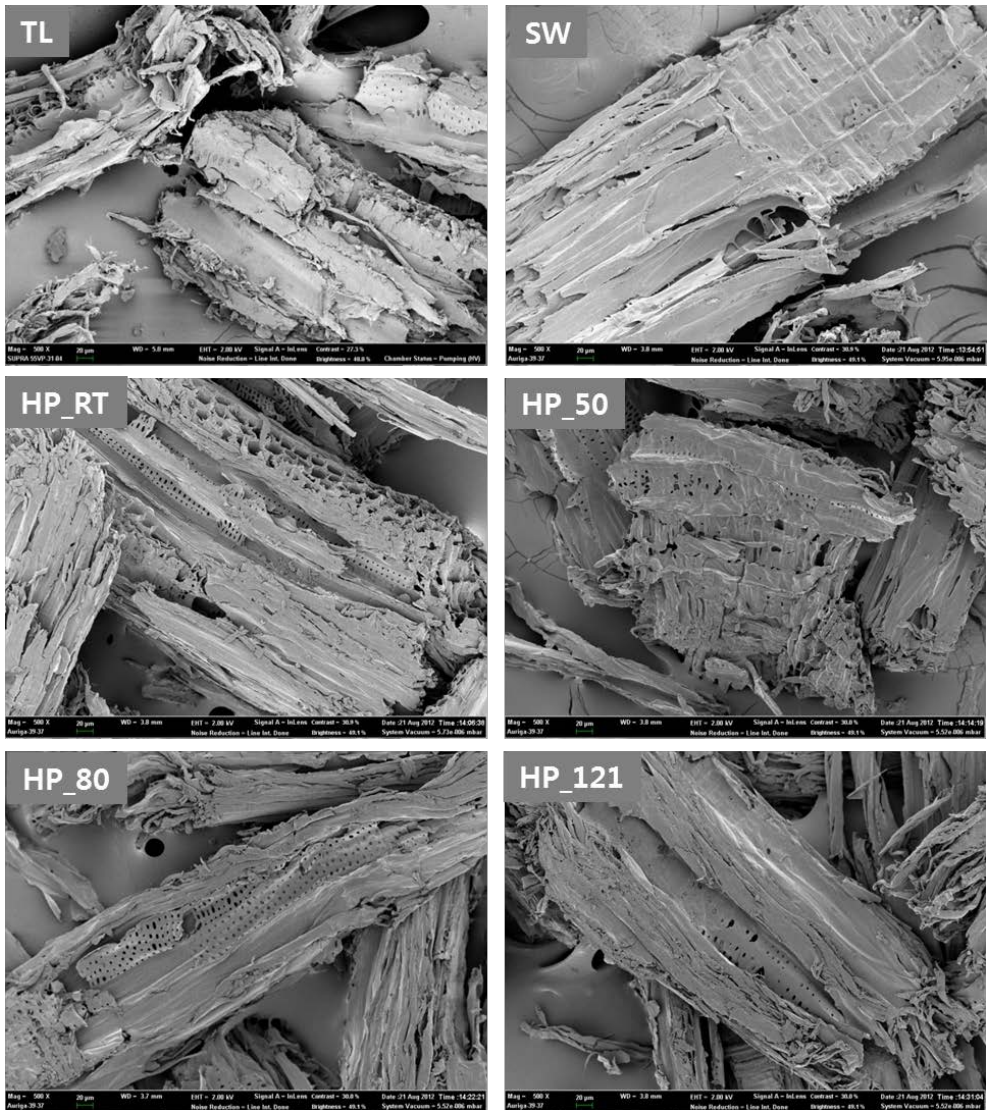


그림 4-15. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 표면 구조 변화

과산화수소 전처리 조건에 따라 바이오매스의 결정화도가 어떻게 변화했는지를 알아보기 위해 XRD 분석을 실시하였고 그 결과를 그림 4-16 에 나타내었다. 예상대로 TL 의 피크가 가장 완만한 곡선을 나타내었으며  $I_{002}$  피크의 세기도 가장 약하게 측정되었다. 과산화수소 전처리 시료의  $I_{002}$  피크는 온도에 따라 강도가 세지고 샤프해지는 경향을 나타내었다. 고온(80 °C) 과산화수소 전처리 시료의 분석 결과와 큰 차이는 없었지만 아임계수로 전처리한 SW 의  $I_{002}$  피크 세기가 가장 강한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 아임계수 전처리 조건에서 상대적으로 결정성 셀룰로오스의 손실이 낮기 때문인 것으로 사료된다.

XRD 측정 결과를 가지고 바이오매스의 CrI 를 계산하여 그림 4-17 에 나타내었다. 각 전처리 시료 별 CrI 값의 변화 양상은 XRD 그래프의  $I_{002}$  피크 세기의 변화 양상과 대체로 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 XRD 그래프의  $I_{002}$  피크 세기와는 달리 과산화수소 전처리 시료에서 가장 높은 CrI 값을 보였다. 과산화수소로 전처리한 시료의 CrI 는 80 °C에 이르기까지 증가하는 경향을 나타냈는데, 반응 온도에 따른 CrI 의 증가는 리그닌이나 헤미셀룰로오스 제거율과 상당한 연관성이 있는 것으로 보인다. 그러나 HP\_121 의 CrI 는 HP\_80 보다 약간 낮은 값을 보였다. 이는 121 °C에서 과산화수소의 빠른 소비로 인해 상대적으로 리그닌의 산화작용에 참여하는 과산화수소의 양이 많지 않았고, 따라서 결정성 셀룰로오스의 손실도 같이 줄어들었기 때문인 것으로 판단된다.

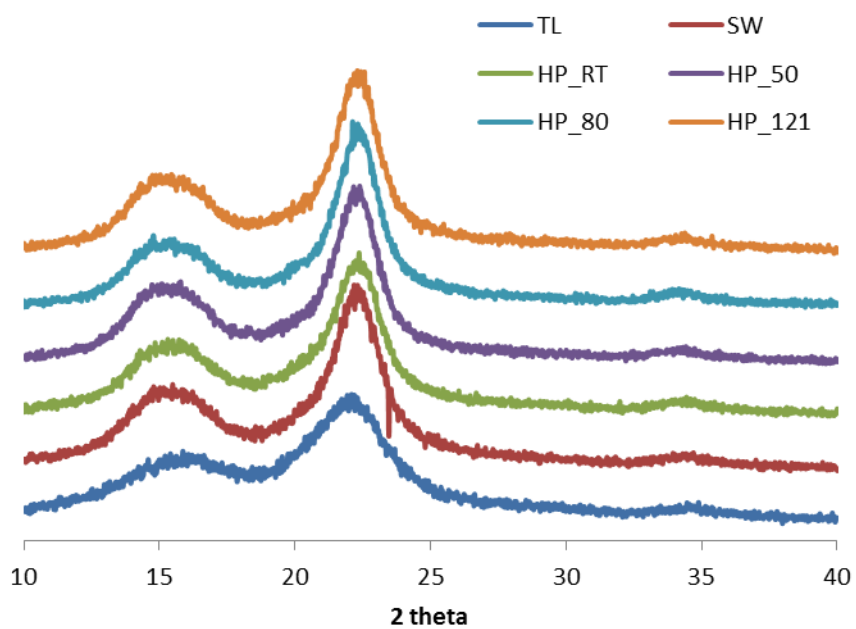


그림 4-16. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 XRD 분석 결과

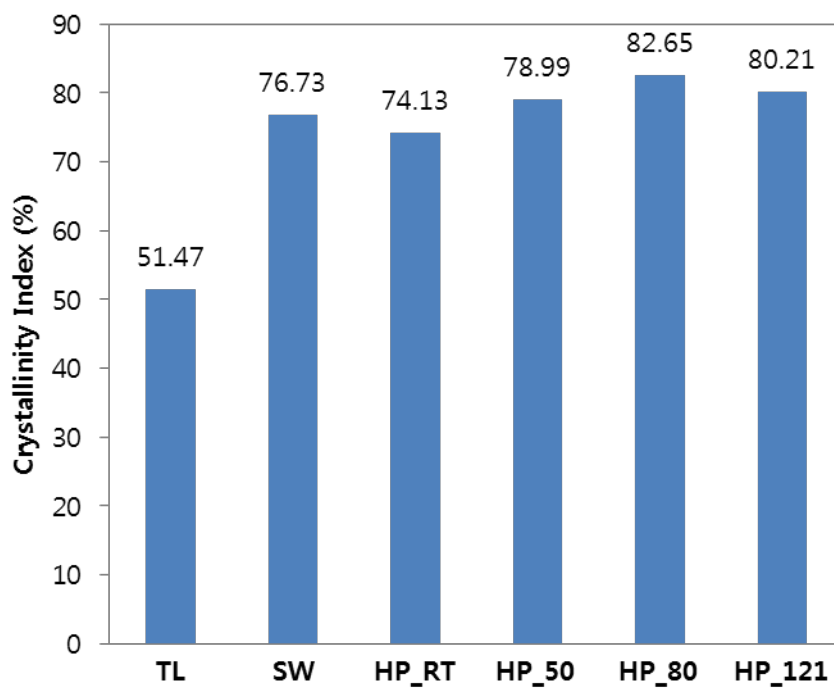


그림 4-17. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른 결정화도 변화

#### 4.4.3. 전처리 조건에 따른 효소 당화율 변화

##### 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리에 따른 효소 당화율 변화

백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리에 따른 효소 당화율을 TL 의 당화율과 비교하기 위하여 5 FPU/g cellulose 의 celluclast 1.5L 과 10 CBU/g cellulose 의 Novozyme 188 을 투입하여 48 h 동안 효소 당화를 실시하였고 정해진 시간마다 당화율을 측정하였다. 그 결과를 그림 4-18 의 그래프에 정리하여 나타내었다.

실험 결과 포도당 수율은 리그닌 제거 수율, 헤미셀룰로오스 제거 수율, 전처리 온도에 모두 비례하는 것으로 나타났다. 특히 RT 의 경우 비교적 높은 헤미셀룰로오스 제거 수율에도 불구하고 TL 보다 약간 높은 수준의 당화율을 기록하였는데, 이는 상대적으로 매우 낮은 리그닌 제거 수율과 연관이 있는 것으로 보인다. 50 과 80 은 같은 조건에서 행해진 아임계수 전처리 시료의 효소 당화(그림 3-11) 에 비해 높은 포도당 수율을 보였다. 220 °C 5 min 의 아임계수 전처리 조건에서는 유사리그닌의 생성 및 침전이 일어나 효소의 작용을 방해하는 점과 전처리 후 시료를 건조시켜 효소 당화에 이용하였기 때문에 섬유 각질화의 영향을 받은 점 등이 아임계수 전처리 시료가 상대적으로 낮은 효소 당화율을 보인 주요 원인으로 사료된다. 결과만을 놓고 보았을 때는 헤미셀룰로오스 뿐만 아니라 리그닌의 분획에도 장점을 보이는 과산화수소 전처리가 아임계수 전처리에 비해 당화 속도 면에서 유리하나 전처리 과정에서 셀룰로오스의 손실율이 더

크므로 이론적으로 얻을 수 있는 당의 양이 상대적으로 적다는 점은  
생각해봐야 할 문제이다.



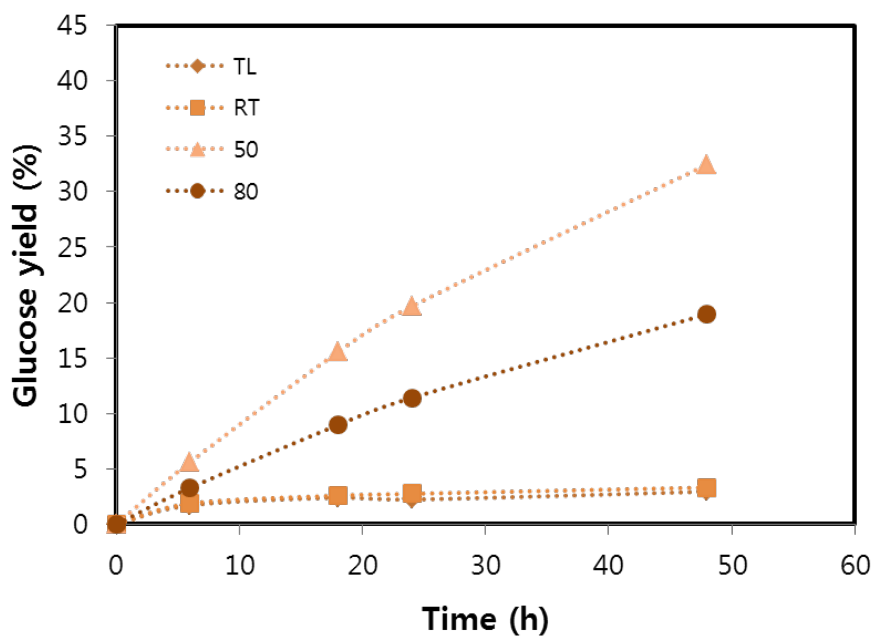


그림 4-18. 백합나무 탈지 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른  
시간별 효소 당화율

## 아임계수 처리 시료의 과산화수소 전처리에 따른 효소 당화율 변화

SW 를 과산화수소 전처리하여 얻은 고상 시료를 가지고 위와 같은 조건에서 효소 당화를 실시하였다. 그 결과를 비교하기 위해 SW 및 TL 의 효소 당화 결과와 함께 그림 4-19 에 나타내었다.

실험 결과 아임계수 전처리를 한 번 거친 과산화수소 전처리 고상 시료의 당화율은 모든 온도 조건에서 두 배 이상 상승하는 것으로 나타났다. 그러나 포도당 수율의 순서는 TL 의 전처리 결과와는 다른 경향을 나타내었다. 앞선 실험과는 달리 전처리 온도에 따른 경향성은 나타나지 않았으며, 아임계수 처리를 거친 시료의 경우 50 ℃와 80 ℃의 온도에서 전처리한 시료의 당화 결과가 비슷하게 나타났다. HP\_RT 의 경우 앞선 실험의 RT 에 비해 포도당 수율이 현저하게 높아지는 것을 확인하였으며, 특히 초기(6 h) 당화 속도가 다른 시료들에 비해 가장 빨랐다.

2 단계 전처리를 거친 결과 고상 시료의 효소 당화율은 TL 에 비해서는 최대 약 14 배, 1 단계인 SW 에 비해서는 최대 약 2.9 배 상승하는 것으로 확인되었다. 이는 아임계수 전처리 시료의 당화율 대비 개미산 전처리 시료의 당화율 증가 정도와 비슷하나 약간 낮은 수준이다.

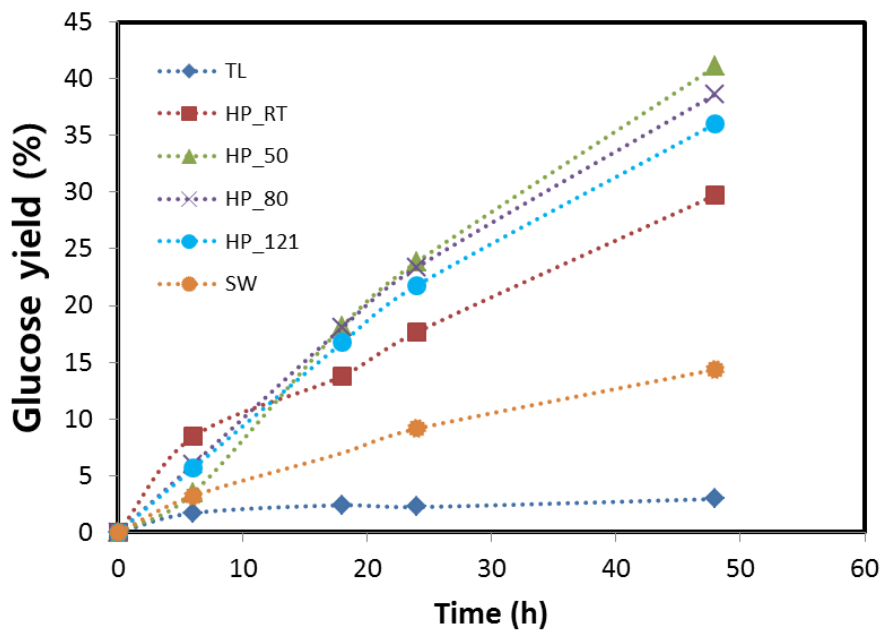


그림 4-19. 아임계수 전처리 시료의 과산화수소 전처리 조건에 따른  
시간별 효소 당화율

## 2 단계 전처리와 선행 연구의 효소 당화 결과 비교

3 절에서 살펴보았던 아임계수 + 개미산 전처리와 4 절에서 살펴본 아임계수 + 과산화수소 전처리의 효소 당화 결과를 선행 연구의 효소 당화 결과와 비교하여 표 4-5 에 정리하였다. 다양한 측면에서의 비교를 위하여 개미산 및 알칼리성 과산화수소 의 단일 전처리, 효소 투입량이 적은 다른 형태의 단일 전처리, 2 단계로 이루어지는 다른 형태의 전처리 방법을 비교 대상으로 선정하였다.

문헌마다 실험 조건이 다르기 때문에 직접적인 비교는 어려우나, 본 연구의 2 단계 전처리를 통한 포도당 수율은 비슷한 농도의 효소를 이용한 다른 단일 전처리 방법에 비해 비교적 높게 관찰되었다. 그러나 그 차이가 월등하지는 않았다. 한편 다른 전처리 방법의 조합으로 이루어진 2 단계 전처리의 효소 당화 결과와 비교해보면 본 연구의 2 단계 전처리 방법이 상대적으로 낮은 당화율을 보이는 것으로 나타났다. 본 연구가 아직 기술 개발의 초기 단계에 있음을 감안하면 이러한 결과는 예상 가능한 것이며, 향후 추가 연구를 통한 각 단계별 전처리 조건의 최적화를 통해 어느 정도의 당화율 향상이 가능할 것으로 판단된다.

표 4-5. 2 단계 전처리와 선행 연구의 효소 당화 결과 비교

원료	전처리 방법	전처리 조건	효소 투입량	효소당화 시간 (h)	포도당 수율(%)	참고문헌
Tulip tree	SW + FA	220 °C, 5 min + 121 °C, 2 h	5 FPU/g substrate	48	43.7	This work
			10 CBU/g substrate	120	64	
Tulip tree	SW + HP	200 °C, 10 min + 50 °C, 7 day	5 FPU/g substrate	48	41.1	This work
			10 CBU/g substrate			
Sugarcane baggase	FA (60%)	121 °C, 90 min, 15% w/v	unknown	72	79.1 (recovery sugar)	[30]
Sugarcane baggase	Alkaline H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 °C, 24 h, 5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 4% w/v,	3.5 FPU/g substrate 1.0 CBU/g substrate	unknown	30.9	[122]
Bamboo	Alkaline H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90 °C, 60 min, 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 1% w/v	20 FPU/g substrate	48	39.9	[117]
Barley straw	DA	180 °C, 30 min, 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10% w/v	5 FPU/g straw	24	37.4 (conversion)	[123]
Duglas-fir	SO <sub>2</sub> -steam	200 °C, 5 min	5 FPU/g 10 CBU/g	72	16	[124]
Spruce	SO <sub>2</sub> -steam	215 °C, 5 min	5 FPU/g cellulose 5 nkat/g cellulose	48	34.1	[125]
Rice straw	AA + DA	190 °C, 20 min + 130 °C, 20 min	60 FPU/g 30 CBU/g	24	96.9	[126]
Poplar	SO <sub>2</sub> -steam + Organosolv	170 °C, 15 min + 170 °C, 60 min	5 FPU/g cellulose 10 CBU/g cellulose	72	88 (conversion)	[127]

SW = subcritical water, FA = Formic acid, HP = hydrogen peroxide, DA = dilute acid, AA = Aqueous ammonia

#### 4.5. 결론

선행 연구에서 제시된 망간(III) 아세테이트 촉매 하에서 실온 과산화수소 전처리법의 성능을 검증하고자 우선 백합나무 탈지 시료를 이용하여 반응 온도별로 전처리 실험을 진행하였다. 그 결과 리그닌의 분획과 함께 헤미셀룰로오스의 분획도 함께 확인하였으며, 리그닌 보다는 오히려 헤미셀룰로오스의 분획 성능이 더 뛰어난 것을 나타냈다. 한편 탈리그닌도와 효소 당화율 측면에서 실온보다는 80 °C가 더 적합한 온도로 확인되었으며, 표백을 고려하는 경우 50 °C가 최적의 온도인 것으로 나타났다.

이러한 결과를 바탕으로 하여 아임계수 전처리를 통해 대부분의 헤미셀룰로오스가 분획된 시료에 대해 과산화수소 전처리를 실시하였다. 그 결과 원 시료 대비 최대 약 91%의 리그닌 분획률을 나타내었고, 모든 전처리 온도 조건에서 아임계수 처리 시료 대비 2 배 이상 향상된 효소 당화율을 얻을 수 있었다. 그러나 상대적으로 셀룰로오스의 손실이 많고 순도가 낮은 것은 극복해야 할 과제이다. 그림 4-20 에 원시료 대비 리그닌 분획률, 효소 당화율, 셀룰로오스 순도, 원시료 대비 글루칸 회수율에 대해 두 공정의 가장 좋은 결과만을 가지고 비교하여 나타내었다. 한편 개미산 공정에서는 당화율 향상을 위한 탈포르밀화 공정이 추가되므로 공정이 더 간단하다는 점을 고려한다면 과산화수소 전처리법이 공정 경제성 면에서는 리그닌 분획 공정의 후보로서 더 유리한 면을 가지고 있는 것으로 생각된다. 망간(III) 아세테이트 촉매를 이용한 과산화수소 전처리법은 아직 연구 초기 단계이므로 여러 가지 공정 조건의 최적화와 리그닌 및 촉매의 회수

방법, 반응 생성물에 대한 추가적인 분석 등에 대한 연구가 추가적으로 필요하다.

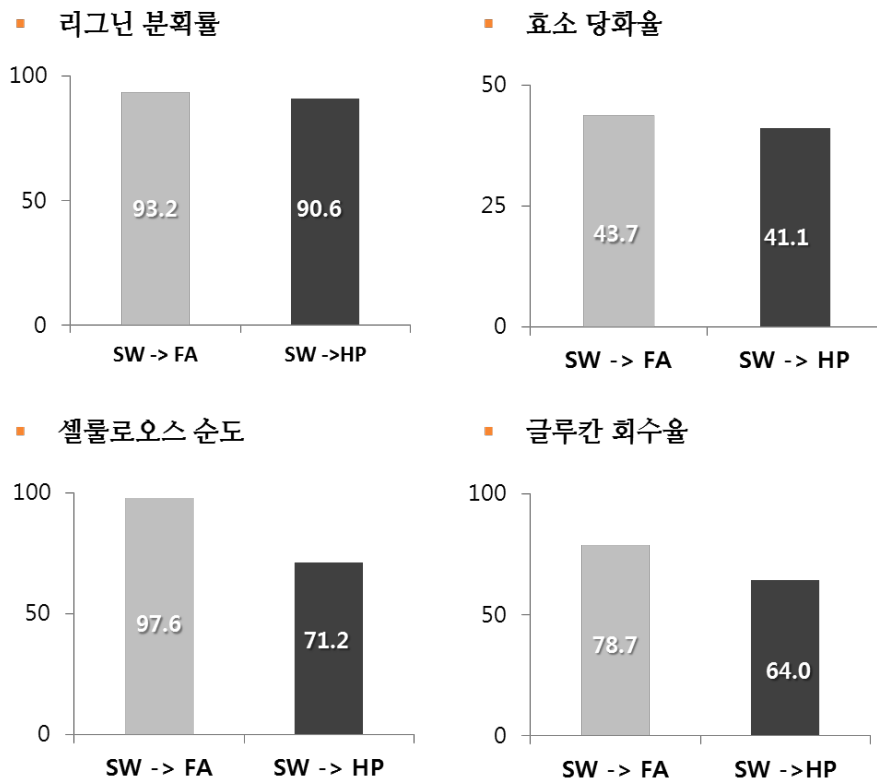


그림 4-20. 아임계수 처리 후 개미산(엷은 회색)과 과산화수소(진한 회색)의 2 단계 처리 공정을 거친 시료의 분석 항목별 최대값 비교

## 5. 종합 결론 및 향후 과제

바이오 리파이너리의 일부로서 헤미셀룰로오스와 리그닌을 순차적으로 분리하는 통합된 전처리 공정을 제시하기 위해 각각의 개별 공정에 대한 고찰을 진행하였다. 헤미셀룰로오스의 분획을 위해 아임계수 전처리법을 도입하였고, 리그닌의 분획을 위해 개미산 전처리법과 과산화수소 전처리법 의 두 가지 공정을 도입하였다. 각 공정의 성능 평가를 위해 분리하고자 하는 성분의 분획률과 고상 시료의 효소 당화율을 비교 분석하였다. 개별 공정으로부터 얻어진 결론과 향후 과제는 다음과 같다.

섬유소계 바이오매스의 모델로 백합나무를 선정하였고 백합나무 탈지 시료로부터 헤미셀룰로오스의 분획을 위해 아임계수 전처리를 실시하였다. 아임계수 전처리에 있어 가장 중요한 공정 변수인 반응 온도와 체류 시간을 하나의 변수로 묶은 가혹성 계수를 도입하여 전처리 전후 화학 조성과 효소 당화율을 비롯한 여러 가지 물리화학적 성질과의 상관관계를 종합적으로 도출하였고 매우 밀접한 연관성이 있음을 확인하였다. 실험 결과 헤미셀룰로오스는 가수분해되어 물에 용해된 형태로 분리되었으며 이 과정에서 일부 리그닌과 셀룰로오스도 같이 용해되어 나오는 것으로 확인되었다. 가혹성 계수가 4.5 이상인 조건에서는 90% 이상의 헤미셀룰로오스 분획률과 80% 이상의 높은 효소 당화율을 나타내는 것을 확인할 수 있었고, 특히 효소 당화에 영향을 주는 인자들 중 헤미셀룰로오스와 같은 비결정성 효소 당화 저해 물질의 제거가 효소 당화 속도와 가장 밀접한 연관성이 있는 것으로 밝혀졌다. 가혹성 계수를 이용하면 반응 조건만으로 전처리의



결과를 예측하는데 큰 도움이 된다. 따라서 향후 공정을 설계하는데 활용하기 위해서는 좀 더 일반화된 데이터가 필요할 것으로 보이며, 이를 위해 여러 가지 다른 바이오매스 원료를 이용한 추가 실험이 진행되어야 한다.

리그닌 분해를 위한 첫 번째 후보 공정으로 개미산 전처리법에 대해 고찰하였다. 헤미셀룰로오스가 분해된 아임계수 전처리 시료를 이용하여 개미산 전처리를 수행한 결과 93% 이상의 높은 리그닌 분해율을 보였으며 그 결과로 97% 이상의 순도를 가지는 셀룰로오스를 얻을 수 있었다. 효소 당화 결과 아임계수 전처리 시료에 비해 당화율이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 아임계수 및 개미산의 순차적 전처리 공정은 나름의 경쟁력이 있는 것으로 평가된다. 그러나 개미산만으로 전처리 시 포르밀기의 생성으로 인한 미세 구조 응집과 포르밀기의 독성이 문제되므로 알칼리 과산화수소 용액을 이용한 추가적인 표백 공정이 필요한 것은 공정 비용을 높일 수 있는 단점으로 지적된다. 추가로 개미산 공정의 최적 조건 확립을 위한 노력도 이루어져야 한다.

리그닌 분해를 위한 두 번째 후보 공정으로 도입된 과산화수소 전처리법은 기존의 알칼리 과산화수소 전처리와는 달리 산성 조건에서 망간(III) 아세테이트를 촉매로 하여 수행되었다. 여기에 대해서는 알려진 연구 결과가 거의 없으므로 우선 백합나무 탈지 시료를 이용하여 전처리를 수행하였고 이를 통해 리그닌 뿐만 아니라 헤미셀룰로오스의 분해에도 효과가 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 아임계수 전처리 시료를 원료로 한 과산화수소 전처리를 수행하였으며 최대 리그닌 분해율은 50 °C에서 원 시료 대비 약 91%로 나타났으며

셀룰로오스의 순도는 약 71%였다. 효소 당화 결과 역시 아임계수 전처리 시료에 비해 모든 조건에서 당화율이 2 배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 과산화수소 공정은 개미산 공정과 비교하여 리그닌의 분획률이나 효소 당화율은 비교적 대등한 것으로 나타났지만 셀룰로오스의 순도와 수율 면에서 개미산 전처리법에 비해 낮은 결과를 보였다. 그러나 반응 조건이 덜 가혹하고 공정이 비교적 간단하다는 점은 개미산 전처리법에 비해 장점으로 생각된다. 그러나 본 연구 결과만을 가지고 두 공정의 우열을 가리기에는 부족하며, 두 방법 모두 연구 초기 단계에 있음을 고려한다면 향후 공정 조건의 최적화를 위한 추가적인 실험이 진행되어야 할 것으로 보인다.

본 연구에서는 목질 성분의 화학적, 구조적 변화를 통한 효소 당화를 향상뿐만 아니라 각 목질 성분 별 분획의 개념을 도입하여 개개의 전처리 공정에 대해서뿐만 아니라 각 공정을 연결한 통합 공정에 대해서도 종합적으로 고찰하였고, 전 단계의 시료를 다음 단계의 원료로 이용하는 단계별 전처리를 실시하였다. 이를 통해 결론적으로 그림 5-1 과 같은 백합나무의 분획 및 전처리 공정을 제안하였다. 그러나 여전히 개개의 공정 별로 많은 부분에서 보완 및 개선해야 할 점들이 남아 있다. 개미산과 과산화수소 탈리그닌 공정에 대해서는 반응 변수들에 대한 추가 실험을 통한 반응 조건의 최적화가 과제로 남아 있다. 또한 분획된 각 성분으로부터 불순물을 제거하기 위한 분리 공정이나 물질의 순도 증가를 위한 노력도 필요하다. 나아가서는 리그닌과 같이 활용도가 상대적으로 떨어지는 물질을 초임계 유체 공정 등을 이용하여 고부가가치화 시키는 연구도 이루어져야 한다. 이러한 노력들이 더해진다면 경제성이 갖춰진 바이오매스 기반 사회가 좀 더

일찍 현실화되는데 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

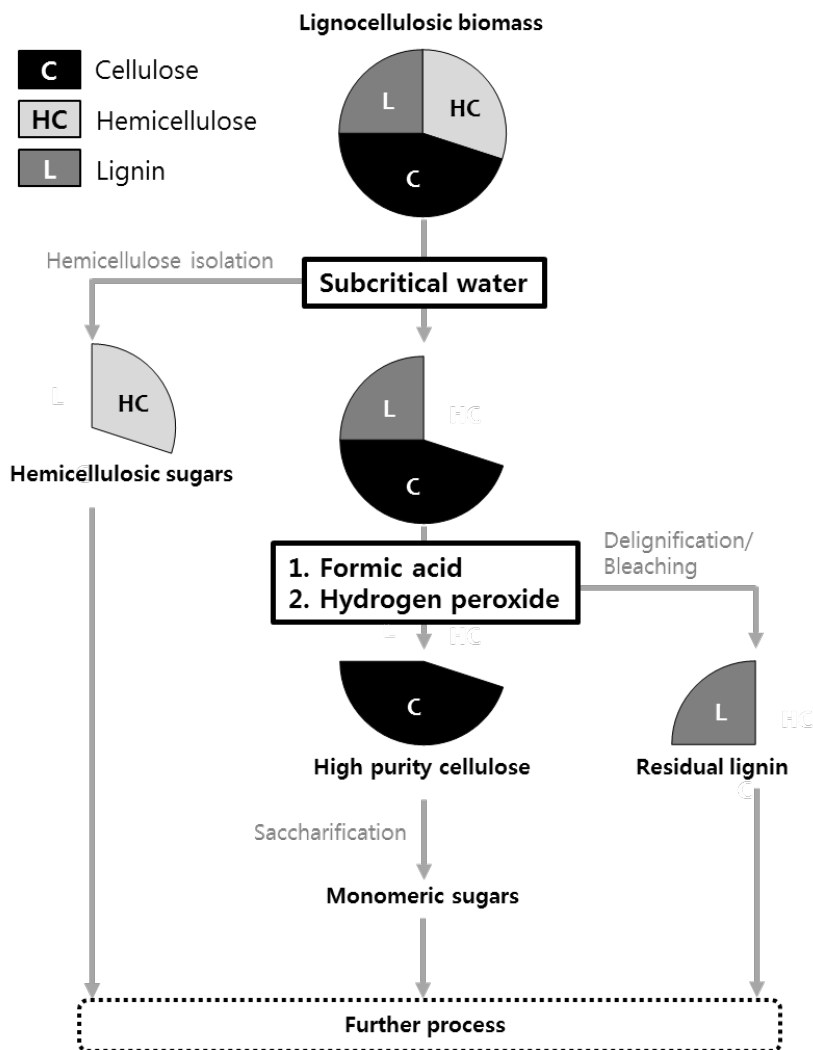


그림 5-1. 제안된 백합나무 분획 및 전처리 공정의 개념도

## 참고 문헌

1. Pei, L. et al., *Conversion of biomass into bioplastics and their potential environmental impacts*. Biotechnology of Biopolymers, 2011: p. 57–74.
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Biomass> [cited 20.05.2013].
3. Lee, S. U. et al., *Bioprocessing aspects of fuels and chemicals from biomass*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2012. **29**(7): p. 831–850.
4. Nzihou, A., *Toward the valorization of waste and biomass*. Waste and Biomass Valorization, 2010. **1**(1): p. 3–7.
5. Reddy, N. and Yang, Y., *Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications*. Trends in Biotechnology, 2005. **23**(1): p. 22–27.
6. Fengel, D. and Wegener, G., *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. 1983, Berlin: de Gruyter.
7. Lu, Q. et al., *Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin*. Food Chemistry, 2012. **135**: p.63–67.
8. Luong, N. D. et al., *An eco-friendly and efficient route of lignin extraction from black liquor and a lignin-based copolyester synthesis*. Polymer Bulletin, 2012. **68**(3): p. 879–890.
9. Barker, B. and Owen, N. L., *Identifying softwoods and hardwoods by infrared spectroscopy*. Journal of Chemical Education, 1999. **76**(12): p. 1706.
10. Garlock, R. J. et al., *Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars*. Bioresource Technology, 2011. **102**(24): p. 11063–11071.
11. Alvira, P. et al., *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review*. Bioresource Technology, 2010. **101**(13): p. 4851–4861.
12. Kumar, R. and Wyman, C. E., *Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies*. Biotechnology Progress, 2009. **25**(2): p. 302–314.
13. Sun, Y. and Cheng, J., *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology, 2002. **83**(1): p. 1–11.
14. Mani, S. et al., *Grinding performance and physical properties of wheat*

- and barley straws, corn stover and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*, 2004. **27**(4): p. 339–352.
15. Hendriks, A. and Zeeman, G., *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 2009. **100**(1): p. 10.
  16. Um, B.-H. et al., *Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR)*. *Bioresource Technology*, 2013. **130**: p. 38–44.
  17. Ma, H. et al., *Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment*. *Bioresource Technology*, 2009. **100**(3): p. 1279–1284.
  18. Carvalheiro, F. et al., *Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments*, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2008. **67**: p.849–864.
  19. Taherzadeh, M. J. and Karimi, K., *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008. **9**(9): p. 1621–1651.
  20. Kaar, W. E. and Holtzapple, M. T., *Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover*. *Biomass and Bioenergy*, 2000. **18**(3): p. 189–199.
  21. Chang, V. S. et al., *Lime pretreatment of switchgrass*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997. **63**(1): p. 3–19.
  22. Chang, V. S. et al., *Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998. **74**(3): p. 135–159.
  23. Saha, B. C. and Cotta, M. A., *Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol*. *Biomass and Bioenergy*, 2008. **32**(10): p. 971–977.
  24. Mosier, N. et al., *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 2005. **96**(6): p. 673–686.
  25. Azzam, A., *Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation*. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 1989. **24**(4): p. 421–433.
  26. Wyman, C., *Handbook on bioethanol: production and utilization*, 1996, Washington: CRC press.
  27. Nguyen, Q. A. et al. *Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000. 84–86: p. 561–576.

28. Sannigrahi, P. et al., *Effects of two-stage dilute acid pretreatment on the structure and composition of lignin and cellulose in loblolly pine*. Bioenergy Research, 2008. **1**(3-4): p. 205-214.
29. Kootstra, A. M. J. et al., *Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw*. Biochemical Engineering Journal, 2009. **46**(2): p. 126-131.
30. Sindhu, R. et al., *Formic acid as a potential pretreatment agent for the conversion of sugarcane bagasse to bioethanol*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **162**(8): p. 2313-2323.
31. Xu, J. et al., *Investigation of acetic acid-catalyzed hydrothermal pretreatment on corn stover*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **86**(2): p. 509-516.
32. García-Cubero, M. T. et al., *Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw*. Bioresource Technology, 2009. **100**(4): p. 1608-1613.
33. Zhao, X. et al., *Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **82**(5): p. 815-827.
34. Aziz, S. and Sarkanen, K., *Organosolv pulping (a review)*. Tappi Journal, 1989. **72**(3): p. 169-175.
35. Swatloski, R. P. et al., *Dissolution of cellose with ionic liquids*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(18): p. 4974-4975.
36. Moulthrop, J. S. et al., *High-resolution <sup>13</sup>C NMR studies of cellulose and cellulose oligomers in ionic liquid solutions*. Chemical Communications, 2005. **12**: p. 1557-1559.
37. Hayes, D. J., *An examination of biorefining processes, catalysts and challenges*. Catalysis Today, 2009. **145**(1): p. 138-151.
38. Negro, M. et al., *Changes in various physical/chemical parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment*. Biomass and Bioenergy, 2003. **25**(3): p. 301-308.
39. Montané, D. et al., *Fractionation of wheat straw by steam-explosion pretreatment and alkali delignification. Cellulose pulp and byproducts from hemicellulose and lignin*. Journal of Wood Chemistry and Technology, 1998. **18**(2): p. 171-191.
40. Nunes, A. and Pourquie, J., *Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood*. Bioresource Technology, 1996. **57**(2): p.

- 107–110.
41. Felizón, B. et al., *Steam-explosion pretreatment of olive cake*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000. **77**(1): p. 15–22.
  42. Tengborg, C. et al., *Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production*, in *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. 1998, Springer. p. 3–15.
  43. Brownell, H. et al., *Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop*. Biotechnology and Bioengineering, 1986. **28**(6): p. 792–801.
  44. Vegas, R. et al., *Hydrothermal processing of rice husks: Effects of severity on product distribution*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2008. **83**(7): p. 965–972.
  45. Carvalheiro, F. et al., *Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009. **153**(1–3): p. 84–93.
  46. Kabel, M. A. et al., *Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw*. Bioresource Technology, 2007. **98**(10): p. 2034–2042.
  47. Yu, G. et al., *Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **160**(2): p. 539–551.
  48. Romani, A. et al., *Bioethanol production from hydrothermally pretreated Eucalyptus globulus wood*. Bioresource Technology, 2010. **101**(22): p. 8706–8712.
  49. Goh, C. S. et al., *Pretreatment of oil palm frond using hot compressed water: An evaluation of compositional changes and pulp digestibility using severity factors*. Bioresource Technology, 2012. **110**: p. 662–669.
  50. Laureano-Perez, L. et al., *Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass*, in *Twenty-sixth symposium on biotechnology for fuels and chemicals*. 2005. Springer.
  51. Kumar, P. et al., *Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2009. **48**(8): p. 3713–3729.
  52. Blanch, H. W. et al., *Biomass deconstruction to sugars*. Biotechnology Journal, 2011. **6**(9): p. 1086–1102.
  53. Overend, R. and Chornet, E., *Fractionation of lignocellulosics by steam-*



- aqueous pretreatments [and discussion]*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 1987. **321**(1561): p. 523–536.
54. Chum, H. L. et al., *Pretreatment–catalyst effects and the combined severity parameter*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1990. **24**(1): p. 1–14.
  55. Garrote, G. et al., *Hydrothermal processing of lignocellulosic materials*. European Journal of Wood and Wood Products, 1999. **57**(3): p. 191–202.
  56. Arai, Y. et al., *Supercritical Fluid: Molecular Interactions, Physical Properties, and New Applications*. 2002: Springer.
  57. 日本化学工学会 超臨界流体分科 編, *超臨界流体入門*. 2008, Japan: 丸善.
  58. Shin, Y. H. et al., *Supercritical water oxidation of wastewater from acrylonitrile manufacturing plant*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **163**(2): p. 1142–1147.
  59. Shin, Y. H. et al., *Synergetic effect of copper–plating wastewater as a catalyst for the destruction of acrylonitrile wastewater in supercritical water oxidation*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **167**(1): p. 824–829.
  60. Yoshida, K. et al., *Characterization of low molecular weight organic acids from beech wood treated in supercritical water*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005. **123**(1–3): p. 795–806.
  61. Sasaki, M. et al., *Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water*. The Journal of Supercritical Fluids, 1998. **13**(1–3): p. 261–268.
  62. Möller, M. et al., *Subcritical water as reaction environment: Fundamentals of hydrothermal biomass transformation*. ChemSusChem, 2011. **4**(5): p. 566–579.
  63. Hunter, S. E. and Savage, P. E., *Recent advances in acid–and base–catalyzed organic synthesis in high–temperature liquid water*. Chemical Engineering Science, 2004. **59**(22): p. 4903–4909.
  64. Leschinsky, M. et al., *Detailed mass balances of the autohydrolysis of Eucalyptus globulus at 170 C*. BioResources, 2009. **4**(2): p. 687–703.
  65. Dunn, J. B. et al., *Terephthalic acid synthesis in supercritical water*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2002. **344**(3–4): p. 385–392.
  66. Brasch, D. and Free, K., *Prehydrolysis–kraft pulping of Pinus radiata grown in New Zealand*. Tappi, 1965. **48**(4): p. 245–248.
  67. Garrote, G. et al., *Valorisation of waste fractions from autohydrolysis of*

- selected lignocellulosic materials*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2003. **78**(4): p. 392–398.
68. Sluiter, A. et al., *Determination of ash in biomass*. Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory (NREL)/TP-510-42622. 2008, Golden.
  69. Sluiter, A. et al., *Determination of extractives in biomass*. Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory (NREL)/TP-510-42619. 2008, Golden.
  70. Sluiter, A. et al., *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass*. Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory (NREL)/TP-510-42618. 2008, Golden.
  71. 임정원, *화분식 반응기에서 초임계 메탄올을 이용한 RBD 팜유의 전이에스테르화반응에 관한 연구*, 2006, 서울대학교 대학원.
  72. Ghose, T., *Measurement of cellulase activities*. Pure and Applied Chemistry, 1987. **59**(2): p. 257–268.
  73. Segal, L. et al., *An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer*. Textile Research Journal, 1959. **29**(10): p. 786–794.
  74. Lloyd, T. A. and Wyman, C. E., *Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids*. Bioresource Technology, 2005. **96**(18): p. 1967–1977.
  75. Varga, E. et al., *Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004. **114**(1–3): p. 509–523.
  76. Weiss, N. D. et al., *High xylose yields from dilute acid pretreatment of corn stover under process-relevant conditions*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009. **155**(1–3): p. 115–125.
  77. Sasaki, M. et al., *Dissolution and hydrolysis of cellulose in subcritical and supercritical water*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2000. **39**(8): p. 2883–2890.
  78. Sannigrahi, P. et al., *Pseudo-lignin and pretreatment chemistry*. Energy & Environmental Science, 2011. **4**(4): p. 1306–1310.
  79. Li, J. et al., *Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion*. Bioresource Technology, 2007. **98**(16): p. 3061–3068.
  80. Hashaikeh, R. et al., *Hydrothermal dissolution of willow in hot*

- compressed water as a model for biomass conversion*. Fuel, 2007. **86**(10): p. 1614–1622.
81. Hu, F. et al., *Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis*. Bioresource Technology, 2012.
  82. Kumar, L. et al., *The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility*. Bioresource Technology, 2012. **103**(1): p. 201–208.
  83. Park, S. et al., *Research Cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance*. Biotechnology for Biofuels, 2010. **3**: p.1–10.
  84. Kang, E.-S. et al., *Efficient preparation of DHMF and HMFA from biomass-derived HMF via a Cannizzaro reaction in ionic liquids*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2012. **18**(1): p. 174–177.
  85. Phaiboonsilpa, N. et al., *Two-step hydrolysis of Japanese cedar as treated by semi-flow hot-compressed water*. Journal of Wood Science, 2010. **56**(4): p. 331–338.
  86. Myint, A. A. et al., *Impact of bleaching on subcritical water-and Formosolv-pretreated tulip tree to enhance enzyme accessibility*. Bioresource Technology, in press. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.069.
  87. Luo, X. and Zhu, J., *Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses*. Enzyme and Microbial Technology, 2011. **48**(1): p. 92–99.
  88. Kim, S. and Holtzapple, M. T., *Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover*. Bioresource Technology, 2006. **97**(4): p. 583–591.
  89. Puri, V. P., *Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification*. Biotechnology and Bioengineering, 1984. **26**(10): p. 1219–1222.
  90. Díaz, M. J. et al., *Hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks*. Fuel, 2011. **90**(11): p.3225–3229.
  91. Weil, J. et al., *Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997. **68**(1–2): p.21–40.
  92. Kim, Y. et al., *Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar*. Biotechnology Progress, 2009. **25**(2): p.340–348.
  93. Goh, C. S. et al., *Hot compressed water pretreatment of oil palm fronds to*

- enhance glucose recovery for production of second generation bio-ethanol. *Bioresource Technology*, 2010. **101**(19): p.7362–7367.
94. Wyman, C. E. et al., *Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources*. *Bioresource Technology*, 2011. **102**(24): p.11052–11062.
  95. Koo, B.-W. et al., *Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of Liriodendron tulipifera and the effect on enzymatic hydrolysis*. *Biomass and Bioenergy*, 2012. **42**: p.24–32.
  96. Muurinen, E., *Organosolv pulping: A review and distillation study related to peroxyacid pulping*. Vol. 146. 2000: Oulun yliopisto.
  97. Pan, X.-J. and Sano, Y., *Atmospheric acetic acid pulping of rice straw IV: Physico-chemical characterization of acetic acid lignins from rice straw and woods. Part 1. Physical characteristics*. *Holzforschung*, 1999. **53**(5): p. 511–518.
  98. Ligeró, P. et al., *Delignification of Eucalyptus globulus saplings in two organosolv systems (formic and acetic acid): Preliminary analysis of dissolved lignins*. *Industrial Crops and Products*, 2008. **27**(1): p. 110–117.
  99. Baeza, J. et al., *Organosolv-pulping III*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991. **31**(3): p. 273–282.
  100. Kham, L. et al., *Bleaching of solvent delignified wheat straw pulp*. *Appita Journal*, 2005. **58**(2): p. 135–137.
  101. Yu, Z. et al., *The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis*. *Bioresource Technology*, 2011. **102**(19): p. 9083–9089.
  102. Grethlein, H. E., *The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates*. *Nature Biotechnology*, 1985. **3**(2): p. 155–160.
  103. Wong, K. K. et al., *The relationship between fiber-porosity and cellulose digestibility in steam-exploded Pinus radiata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988. **31**(5): p. 447–456.
  104. Landry, M. R., *Thermoporometry by differential scanning calorimetry: Experimental considerations and applications*. *Thermochimica Acta*, 2005. **433**(1): p. 27–50.
  105. Grous, W. R. et al., *Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1986. **8**(5): p. 274–280.

106. Oh, S. Y. et al., *Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy*. Carbohydrate Research, 2005. **340**(15): p. 2376–2391.
107. Himmelsbach, D. S. et al., *The use of FT-IR microspectroscopic mapping to study the effects of enzymatic retting of flax (*Linum usitatissimum* L) stems*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002. **82**(7): p. 685–696.
108. Sun, Y. et al., *Structural changes of bamboo cellulose in formic acid*. BioResources, 2008. **3**(2): p. 297–315.
109. Marechal, Y. and Chanzy, H., *The hydrogen bond network in  $I_{\beta}$  cellulose as observed by infrared spectrometry*. Journal of Molecular Structure, 2000. **523**(1): p. 183–196.
110. Kondo, T. and Sawatari, C., *A Fourier transform infra-red spectroscopic analysis of the character of hydrogen bonds in amorphous cellulose*. Polymer, 1996. **37**(3): p. 393–399.
111. Zhu, L. et al., *Structural features affecting biomass enzymatic digestibility*. Bioresource Technology, 2008. **99**(9): p. 3817–3828.
112. Sun, R. et al., *Delignification of maize stems by peroxymonosulfuric acid, peroxyformic acid, peracetic acid, and hydrogen peroxide. 1. Physicochemical and structural characterization of the solubilized lignins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(4): p. 1253–1262.
113. Strukul, G., *Catalytic oxidations with hydrogen peroxide as oxidant*. 1992, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
114. Gould, J. M., *Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification*. Biotechnology and Bioengineering, 1984. **26**(1): p. 46–52.
115. Gould, J. M., *Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen peroxide*. Biotechnology and Bioengineering, 1985. **27**(6): p. 893–896.
116. Silverstein, R. A. et al., *A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks*. Bioresource Technology, 2007. **98**(16): p. 3000–3011.
117. Yamashita, Y. et al., *Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo*. Carbohydrate Polymers, 2010. **79**(4): p. 914–920.

118. Lucas, M. et al., *Evidence for room temperature delignification of wood using hydrogen peroxide and manganese acetate as a catalyst*. Bioresource Technology, 2012. **119**: p.174–180.
119. Davies, G., *Some aspects of the chemistry of manganese (III) in aqueous solution*. Coordination Chemistry Reviews, 1969. **4**(2): p. 199–224.
120. Davies, G. et al., *Kinetics and stoichiometry of the reaction between manganese (III) and hydrogen peroxide in acid perchlorate solution*. Inorganic Chemistry, 1968. **7**(1): p. 146–154.
121. Bodini, M. E. and Sawyer, D. T., *Electrochemical and spectroscopic studies of manganese (II), –(III), and –(IV) gluconate complexes. 2. Reactivity and equilibriums with molecular oxygen and hydrogen peroxide*. Journal of the American Chemical Society, 1976. **98**(26): p. 8366–8371.
122. Rabelo, S. C. et al., *Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide*. Biomass and Bioenergy, 2011. **35**(7): p.2600–2607.
123. Panagiotopoulos, I. A. et al., *Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds*. Journal of Cleaner Production, 2012. **32**: p.45–51.
124. Kumar, L. et al., *The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility*. Bioresource Technology, 2012. **103**(1): p.201–208.
125. Várnai, A. et al., *Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose*. Enzyme and Microbial Technology, 2010. **46**(3): p.185–193.
126. Kim, J.-W. et al., *Two-stage pretreatment of rice straw using aqueous ammonia and dilute acid*. Bioresource Technology, 2011. **109**(19): p.8992–8999.
127. Panagiotopoulos, I. A. et al., *A two-stage pretreatment approach to maximise sugar yield and enhance reactive lignin recovery from poplar wood chips*. Bioresource Technology, 2013. **130**: p.570–577.

## **Abstract**

# **A Study on Fractionation Process of Tulip Tree Based on Subcritical Water Pretreatment**

Dae Sung Kim

School of Chemical and Biological Engineering

The Graduate School

Seoul National University

In recent years, concerns about environmental problems have been raised and depletion of crude oil has been issued all over the world. A variety of efforts has been attempted to overcome the limit of the traditional petroleum-based industry. Biomass has been considered as a promising alternative resource since it can satisfy the demand for a source of the alternative energy as well as raw materials of both commodity and specialty chemicals. The sugars obtained from biomass can be converted into fuel such as bio-ethanol through the fermentation process. The biomass derived materials even can be a source of plastics through chemical and biological treatments. Lignocellulosic biomass is the most abundant natural resource on earth, which primarily consists of three natural polymers; cellulose, hemicellulose, and lignin. However, there is a hurdle for the efficient utilization of lignocellulosic biomass without any pretreatment due to

its complex microstructure and various components. Thus, pretreatment of lignocellulosic biomass is a crucial step for increasing the efficiency of further processing such as saccharification and fermentation.

In this work, development of a novel integrated pretreatment process has been attempted to enhance enzymatic digestibility and to fractionate lignocellulosic components. A subcritical water pretreatment process was introduced to isolate hemicellulose, and a formic acid and a hydrogen peroxide pretreatment process were applied for delignification and cellulose purification. Performance of each individual pretreatment method and their combination was investigated. The pretreated samples were analyzed by both quantitative and qualitative methods and saccharified by enzymatic hydrolysis.

As a first stage, subcritical water pretreatment was performed to isolate hemicellulose from tulip tree sawdust under various conditions. Various physicochemical features and enzymatic digestibility of the pretreated products can be correlated with the severity factor. The characteristics of the pretreated solids according to the pretreatment severity were strongly related with the glucose yield. The removal of structural barriers such as hemicellulose to the enzyme attack was the dominant factor affecting enzyme accessibility to the substrate. As a second stage, the formic acid pretreatment and hydrogen peroxide pretreatment were performed each other to fractionate lignin from the subcritical water pretreated solids. The solid samples obtained from



both methods were assessed quantitatively as well as qualitatively, and further hydrolyzed to monomeric sugars by enzymatic hydrolysis. Hemicellulose and lignin can be fractionated in high yield from the lignocellulosic biomass by the two-stage sequential pretreatment process. In addition, the remained solids, which mainly consist of cellulose, showed substantially increased glucose yield compared with the substrate from single stage pretreatment. When comparing both delignification processes, the formic acid process was a bit favorable to the hydrogen peroxide process in terms of degree of delignification, cellulose purity, and enzymatic digestibility. However, the formic acid process has some disadvantages such as additional treatment for deformylation and more severe reaction conditions.

Based on the results of this study, a scheme of integrated lignocellulosic biomass pretreatment process was suggested to enhance enzyme digestibility and to fractionate lignocellulosic components.

**Keywords : tulip tree, subcritical water, formic acid, hydrogen peroxide, pretreatment, fractionation**

**Student Number : 2007-21172**